



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO  
PAULO  
CAMPUS DIADEMA



MAYTÊ DOS SANTOS TOLEDO

**Caracterização morfológica e funcional de vesículas  
extracelulares liberadas por células B-1 infectadas  
por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

DIADEMA  
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO  
PAULO

CAMPUS DIADEMA



MAYTÊ DOS SANTOS TOLEDO

**Caracterização morfológica e funcional de vesículas  
extracelulares liberadas por células B-1 infectadas  
por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas *Strictu Sensu* do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – *campus* Diadema

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Xander Batista  
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Trocoli  
Torrecilhas

DIADEMA  
 2018

Toledo, Maytê

Caracterização morfológica e funcional de vesículas extracelulares liberadas por células B-1 infectadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*/ Maytê dos Santos Toledo – Diadema, 2018.  
103 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de São Paulo - *campus* Diadema, 2018.

Orientador: Profa. Dra. Patricia Xander Batista

Co-orientador: Profa. Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

1. Células B-1 2. *Leishmania (L.) amazonensis* 3. Vesículas extracelulares.

CDD 616.9364

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

Candidata: Maytê dos Santos Toledo

Título da dissertação: Caracterização morfológica e funcional de vesículas extracelulares liberadas por células B-1 infectadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Xander Batista

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ...../ ...../ ....., considerou a candidata:

( ) Aprovada

( ) Reprovada

**Examinador:**      **Assinatura.....**

**Nome: Richardt Gama Landgraf**

**Instituição: Universidade Federal de São Paulo**

**Examinadora:**      **Assinatura.....**

**Nome: Karen Sparadi Ferreira**

**Instituição: Universidade Federal de São Paulo**

**Examinador:**      **Assinatura.....**

**Nome: Mauro Javier Cortez Véliz**

**Instituição: Universidade de São Paulo**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a minha orientadora Profa. Dra. Patricia Xander Batista por tornar meu sonho na ciência cada dia mais possível.

Agradeço o apoio e atenção da minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

Agradeço a toda equipe de docentes do Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários: Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas, Dra. Karen Spadari, Dr. Wagner Luiz Batista, Dra. Patricia Santos Lopes e Dra. Patricia Xander Batista, bem como, a todos os discentes do laboratório por toda a colaboração técnica, mas mais ainda pelo carinho e acolhimento que tiveram comigo. Em especial: Fernanda Marins Barbosa, Carolina Rizzaro Costa, André Cronemberger-Andrade, Fúlvio Gabriel Corazza, Natasha Campos Reis, Talita Vieira Dupin, Marina Valente Navarro, Juliana Cristina Calado, Alison Felipe Alencar Chaves, Kleber Ribeiro, Rafael Pedro Madeira e Camilla Ioshida.

Agradeço também, imensamente, aos professores: Dra. Clara Lúcia Barbieri, Dra. Ana Flávia Popi e Dr. Sérgio Schenkman, pela disponibilização de materiais e equipamento;

Agradeço ao apoio técnico (NATEP);

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e todo corpo docente por colaborar na minha formação acadêmica;

Agradeço as agências de fomento CAPES e FAPESP pelo apoio e incentivo financeiro;

Por último, agradeço aos meus pais e amigos por estarem sempre comigo.

## RESUMO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. A resposta imune para a leishmaniose é complexa e o resultado da infecção depende de vários fatores, como composição genética das várias espécies de *Leishmania* e da imunidade do hospedeiro. Sabe-se que macrófagos têm papel central na infecção por parasitas do gênero *Leishmania* e sua ativação pode ser influenciada por diversos tipos celulares, como células Th1, Th2, e linfócitos B-1. Células B-1 são um subtipo de linfócitos B com funções peculiares na imunidade. Essas células são capazes de produzir citocinas reguladoras (principalmente IL-10), anticorpos naturais e se diferenciar em células fagocíticas. Além de citocinas e anticorpos, células B podem liberar diferentes tipos de vesículas extracelulares (EVs) com papel importante na comunicação intercelular, podendo levar a ativação e/ou regulação do sistema imunológico. Contudo, ainda não foi demonstrado a produção de EVs por células B-1 e seu papel na imunidade. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar as EVs liberadas por células B-1; estudar a influência dessas EVs na modulação de macrófagos de linhagem e macrófagos medulares de distintas linhagens de camundongos; e avaliar o papel de EVs de células B-1 no curso da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Nossos resultados mostraram que EVs liberadas por células B-1 infectadas com o parasita modularam diferentemente a ativação de macrófagos da linhagem J774A.1, macrófagos medulares provenientes de camundongos BALB/c e C57BL/6. EVs liberadas espontaneamente por células B-1 levaram a redução na progressão da lesão e da carga parasitária em camundongos BALB/c. Assim, este estudo demonstrou que células B-1 podem liberar EVs que influenciam a modulação de macrófagos *in vitro* além de alterar o curso da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Esta é a primeira evidência da liberação de EVs por células B-1 e o seu papel na comunicação macrófagos-células B-1.

**Palavras-chave:** Células B-1, macrófagos e vesículas extracelulares.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania*. The immune response to leishmaniasis is complex and the outcome of the infection depends on several factors, such as genetic composition of *Leishmania* species and host immunity. Macrophages are known to play a central role in infection by *Leishmania* parasites and their activation may be influenced by several cell types, such as Th1, Th2, and B-1 lymphocytes. B-1 cells are a subtype of B lymphocytes with peculiar functions in immunity. These cells are able to produce regulatory cytokines (mainly IL-10), natural antibodies and differentiate into phagocytic cells. In addition to cytokines and antibodies, B cells can release different types of extracellular vesicles (EVs) with an important role in intercellular communication, with role in regulating activation and/or modulation of the immune system. However, the production of EVs by B-1 cells and their role in immunity have not yet been demonstrated. The aims of this work were to characterize the EVs released by B-1 cells; to study the influence of these EVs on the modulation of lineage macrophages and medullary macrophages from different mouse strains; and to evaluate the role of EVs from B-1 cells in the course of experimental infection by *L. (L.) amazonensis*. Our results showed that EVs released by B-1 cells infected with the parasite led to a differential activation of J774A.1 macrophages, macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice. In addition, EVs released spontaneously by B-1 cells led to a reduction in the lesion progression and parasite burden in BALB/c mice experimentally infected. Thus, this study demonstrated that B-1 cells can release EVs that are capable of altering the functions of macrophages *in vitro*. *In vivo* these EVs altered the course of *L. (L.) amazonensis* infection. This is the first evidence that EVs from B-1 cells can act as a new mechanism of cellular communication between macrophages and B-1 cells.

**Keywords:** B-1 cells, macrophage and extracellular vesicles



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da metodologia empregada .....	51
Figura 2 - Caracterização de EVs de células B-1 por NTA.....	52
Figura 3 - Liberação de EVs de células B-1 vista por MEV .....	53
Figura 4 - Caracterização de EVs de células B-1 por citometria de fluxo .....	54
Figura 5 - Expressão gênica de citocinas em células J774A.1 .....	56
Figura 6 - Expressão gênica de iNOS em células J774A.1 .....	58
Figura 7 - Capacidade fagocítica em células J774A.1.....	59
Figura 8 - Expressão gênica de citocinas em macrófagos de camundongos BALB/c.....	61
Figura 9 - Expressão gênica de citocinas em macrófagos de camundongos C57BL/6.....	62
Figura 10 - Quantificação de citocinas em macrófagos de camundongos BALB/c .....	64
Figura 11 - Quantificação de citocinas em macrófagos de camundongos C57BL/6 .....	65
Figura 12 - Expressão gênica de iNOS em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 .....	67
Figura 13 - Capacidade fagocítica de macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 ....	69
Figura 14 - Avaliação da progressão da lesão e da carga parasitária em animais tratados com Evs provenientes de células B-1 .....	71
Figura 15 - Análise histológica das lesões .....	72
Figura 16 - - Viabilidade de células B-1 infectadas com promastigotas de <i>L. (L.)</i> <i>amazonensis</i> .....	96
Figura 17 Dot Plot representativo de células B-1 purificadas por colunas magnéticas .....	97
Figura 18 - Integridade do RNA .....	98
Figura 20 - Curvas de melting (curva de dissociação) dos genes IL-6, IL-10, iNOS e TNF- $\alpha$ 99	

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores .....	44
Tabela 2 - Distribuição dos grupos e tratamento dos animais .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ARBP**- *attachment region binding protein* (Proteína de ligação da região de fixação)

**ARG** – arginase

**BCG** – Bacilo de Calmette-Guérin

**CD** – *cluster of differentiation*

**CDC** - Centro de Controle de Doenças

**cDNA** – Ácido desoxirribonucleico complementar

**CEDEME** - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia

**CEME** - Centro de Microscopia Eletrônica

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de Carbono

**CONSEA** - Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal

**CR** – receptor do complemento

**CT** – *threshold cycle* (limiar do ciclo)

**DCs** – Células dendríticas

**DMSO** - Dimetilsufóxido

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**DNase** - Desoxirribonuclease

**DO** - Densidade optica

**EVs** – *extracellular vesicles* (vesículas extracelulares)

**G** - força G

**GAPDH** - *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

**GP** – glicoproteína

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de Hidrogênio

**HEPES** - ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico

**IF**- Índice fagocítico

**Ig** – imunoglobulina

**IL** – interleucina

**INF- $\gamma$**  – Interferón gama

**iNOS** – óxido nítrico sintase induzível

**L.** – *Leishmania*

**LPG** – lipofosfoglicano

**MAC** – complexo de ataque a membrana

**MAPKs** - Proteína-quinases ativadas por mitógenos

**MG** – Minas Gerais

**mRNA**- Ácido ribonucleico mensageiro

**MS** – Mato Grosso do Sul

**NADPH** - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

**NLR** – Receptores *Nod-like*

**NO** – óxido nítrico

**PBS** – *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)

**PI** - iodeto de propídeo

**qRT-PCR** – *polymerase chain reaction in real time* (PCR em tempo real)

**R-10** - Meio RPMI acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino

**RJ** – Rio de Janeiro

**RNA** - Ácido ribonucleico

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio

**RPM** – rotação por minute

**SDS** - Dodecilsulfato de sódio

**SFB** - Soro fetal bovino

**SOCS** - Suppressor of cytokine signaling

**SP** – São Paulo

**SPF** - Patógeno livre

**spp.** – Espécie

**SUS** – Sistema único de saúde

**T.** - *Trypanossoma*

**TBE** - Tris/Borato/EDTA

**TGF- $\beta$**  – Fator de crescimento tumoral beta

**Th** – linfócitos T *helper*

**TO** – Tocantins

**TRL** – Receptores *Toll-like*

**UNIFESP** – Universidade Federal de São Paulo

**UV** – ultravioleta

**V.** – Viannia

**XID** - Imunodeficiência ligada ao cromossomo X

## LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

® Marca Registrada

$\alpha$  Alfa

$\beta$  Beta

$\gamma$  Gamma

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	17
Leishmanioses	17
Resposta imunológica na leishmaniose	21
Células B-1	26
Comunicação por vesículas extracelulares (EVs)	29
<b>OBJETIVOS</b>	31
Objetivos específicos	31
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	32
Soluções	32
Meios de cultura	32
Animais	33
Parasitas	33
Congelamento e descongelamento de parasitas	33
Cultura de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	34
Congelamento de macrófagos de linhagem J774A.1 e fibroblastos L929	34
Cultura de macrófagos de linhagem J774A.1	35
Obtenção do sobrenadante de células da linhagem de fibroblastos L929	35
Obtenção e cultivo de macrófagos de origem medular	35
Obtenção e purificação de células B-1 peritoneais	36
Avaliação da população células B-1 por citometria de fluxo	37
Ensaio de infecção <i>in vitro</i> de células B-1	37
Coloração por iodeto de propídeo (PI)	38
Obtenção de EVs liberadas por células B-1	38
Determinação da concentração e tamanho das vesículas extracelulares por aparelho medidor de partículas	38
Dosagem proteica	39
Microscopia eletrônica de varredura das vesículas extracelulares	39
Identificação e marcação de EVs de células B-1 por citometria de fluxo	40
Tratamento de macrófagos com EVs de células B-1	41
Extração de RNA de macrófagos	41
Elektroforese em gel de agarose	42
Tratamento com DNase	42
Produção do cDNA	43
Análise quantitativa por PCR em tempo real	43
Quantificação de citocinas por ELISA	45
Avaliação da capacidade fagocítica	45

Tratamento dos animais com EVs de células B-1.....	46
Determinação de carga parasitária por diluição limitante.....	47
Análises histológicas .....	48
Análises estatísticas.....	49
<b>RESULTADOS</b> .....	49
Caracterização morfológica de EVs liberadas por células B-1 infectadas ou não com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	49
Avaliação do efeito de EVs produzidas por células B-1 em macrófagos de linhagem J774A.1 .....	55
Efeito de EVs de células B-1 em macrófagos medulares provenientes de camundongos da linhagem BALB/c e C57BL/6 .....	60
Papel das EVs de células B-1 na progressão da infecção experimental em camundongos BALB/c.....	70
<b>DISCUSSÃO</b> .....	73
<b>CONCLUSÕES</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81
<b>APÊNDICES</b> .....	95
<b>ANEXOS</b> .....	100



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*. As espécies responsáveis pelas leishmanioses estão agrupadas na ordem *Kinetoplastida* (Honigberg, 1963; Vickerman, 1976), família *Trypanosomatidae* (Doflein, 1901; Grobben, 1905), gênero *Leishmania* (Ross, 1903), no qual pelo menos 21 espécies apresentam importância médica (Bates, 2007). Dados recentemente publicados, mostraram que 97 áreas, entre elas, países e territórios, são consideradas endêmicas para leishmanioses, das quais 65 são endêmicas tanto para forma visceral, como cutâneas da doença (WHO, 2016). Anualmente, são diagnosticados aproximadamente 1,3 milhões de novos casos e, dentre estes, de 20.000 a 30.000 resultam em mortes (WHO, 2015). A doença está associada a condições de desnutrição, deslocamento da população, habitações precárias, sistema imunológico debilitado e a falta de recursos. Além de ser influenciada por mudanças ambientais, tais como desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização (WHO, 2015). Com base nos dados epidemiológicos e carência de recursos para o controle das doenças, a Organização Mundial de Saúde caracterizou as leishmanioses como um grupo de doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2010).

No Brasil, além de endêmicas, as leishmanioses encontram-se em processo de expansão com aumento do número de casos e de urbanização da doença (Ministério da Saúde, 2013a; Ministério da Saúde, 2013b). Tradicionalmente, áreas rurais e periurbanas eram as mais afetadas pelas leishmanioses, contudo processos como a urbanização e desmatamento aceleraram o avanço da doença para centros urbanos, como, por exemplo: Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros (Ministério da Saúde, 2006; Ministério da Saúde, 2007). Em 2015, o ministério da saúde reportou 19.395 novos casos de leishmaniose cutânea e 3.289 para forma visceral da doença (Portal da Saúde SUS, 2016 e WHO, 2015).

O processo de expansão das leishmanioses está bastante associado ao modo de transmissão do parasita por meio de seu inseto vetor. Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético, exigindo um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (inseto vetor). De modo geral, a infecção inicia-se quando o vetor (flebotomíneos da família *Psychodidae*, gêneros *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo) infectado regurgita promastigotas metacíclicos na pele do hospedeiro vertebrado. No interior do novo hospedeiro, os parasitas são fagocitados por polimorfonucleares e mononucleares em processo que envolve a ligação de moléculas de superfície dos parasitas e receptores expressos na superfície das células fagocíticas (Brittingharm *et. al.*, 1995; Green *et. al.*, 1994). Dentro dos fagócitos, os parasitas diferenciam-se em formas amastigotas, que residem e multiplicam-se no interior de fagolisossomos. A proliferação das amastigotas permite o rompimento da membrana celular e a liberação dos parasitas que rapidamente infectam outras células, iniciando uma nova fase de multiplicação, assim evitando as ações de anticorpos e do complemento (Chappuis *et. al.*, 2007). Alguns estudos recentes demonstraram que para algumas espécies de *Leishmania*, como *L. (L.) amazonensis*, as amastigotas podem passivamente passar de um macrófago para outro (Peters *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2008; Gueirard *et al.*, 2008 e Real *et. al.*, 2014). O ciclo prossegue quando o vetor não infectado realiza o repasto sanguíneo e ingere as amastigotas presentes no hospedeiro infectado. No trato digestivo do inseto, as amastigotas transformam-se em promastigotas metacíclicos, podendo assim, iniciar um novo ciclo de desenvolvimento.

Quanto às formas clínicas das leishmanioses, a forma cutânea é a mais comumente diagnosticada. No chamado “Velho Mundo” (Europa, África e Ásia) as espécies causadoras da forma cutânea são: *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) donovani* (WHO, 2010). Por outro lado, o “Novo Mundo” (Américas ou hemisfério ocidental) é afetado principalmente pelas espécies: *Leishmania (Leishmania.) mexicana*, *Leishmania (Leishmania). amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) venezuelensis* (complexo *Leishmania mexicana*), como também pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*,

*Leishmania. (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, e *Leishmania (Viannia) peruviana* (complexo *Leishmania braziliensis*) (WHO, 2010; Brunette *et. al.*, 2017).

A leishmaniose cutânea (ou tegumentar) possui como sintoma inicial lesões na pele que podem se desenvolver após várias semanas ou até mesmo meses depois da inoculação do parasita, podendo persistir por meses a anos. As lesões progridem de pápulas para placas nodulares e destas para lesões ulcerativas, com uma borda elevada e depressão central, cobertas ou não por crosta. Entretanto, apesar das lesões não provocarem nenhum tipo de sensibilidade, essas estão sujeitas a infecções secundárias que levarão a processos inflamatórios dolorosos. Além disso, pacientes com leishmaniose cutânea normalmente apresentam mais de uma lesão primária (em diferentes partes do corpo), lesões satélite, linfadenopatia regional (ocasionalmente bubônica) e/ou linfangite nodular (Brunette *et. al.*, 2017). Contudo, tem sido reportado no Brasil lesões atípicas na leishmaniose cutânea, as quais podem se manifestar como verrucosa, esporotricóide e zoster-like (Guimarães *et al.*, 2016).

Algumas espécies que causam leishmaniose tegumentar podem levar ao desenvolvimento da forma mucocutânea (ou mucosa) da doença. Dentre as espécies causadoras desta forma clínica encontram-se: *Leishmania. (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) panamensis* e com menor incidência *Leishmania. (V.) guyanensis* (espécies do subgênero *Viannia*) e *Leishmania. (L.) amazonensis* (subgênero *Leishmania*). Neste caso, pode ocorrer disseminação dos parasitas da pele para a mucosa, levando ao aparecimento de novas lesões que atingem nariz, boca e garganta (região naso-orofaríngea) e, se não tratada, a doença pode evoluir para forma ulcerativa, levando a danos irreversíveis ao tecido, como por exemplo, a perfuração do septo nasal. A destruição do tecido cartilaginoso pode levar a desfiguração facial, infecções secundárias e bloqueio das vias aéreas (IAMAT, 2016; Torres-Guerrero, 2017 e Consuelo, 2009).

A terceira forma de leishmaniose cutânea e a mais rara é chamada de leishmaniose cutânea difusa. Os sinais e sintomas desta manifestação clínica incluem o aparecimento de nódulos e placas não ulceradas e mais, raramente, a formação de úlceras em várias partes

do corpo do paciente (Barral-Netto, 2009). Acredita-se que este tipo de manifestação clínica seja ocasionado pela condição imunológica e aspectos genéticos dos pacientes bem como características dos parasitas. A leishmaniose difusa é tipicamente causada por *Leishmania (L.) aethiopica*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) braziliensis* e *Leishmania (L.) pifanoi*, afetando principalmente as regiões da Etiópia, Quênia, Brasil e Venezuela (Torres-Guerrero, 2017; IAMAT 2016).

A forma visceral da doença e a de maior gravidade pode levar o hospedeiro ao óbito. Nessa forma da doença os parasitas podem disseminar para o fígado, baço, medula óssea e pele e os sintomas podem demorar semanas a meses para aparecer. As manifestações clínicas são variadas, podendo incluir: febre, caquexia (perda de peso), hepatoesplenomegalia (aumento de fígado e baço), pancitopenia (anemia, leucopenia e trombocitopenia), entre outras (Brunette *et. al.*, 2017 e IAMAT, 2016). Se não tratada adequadamente, a leishmaniose visceral pode ser fatal. As espécies responsáveis são *Leishmania (L.) donovani* (afetando Índia e leste africano), *Leishmania (L.) infantum* (na área mediterrânea) e *Leishmania (L.) infantum chagasi*, *Leishmania (L.) tropica* e *Leishmania (L.) amazonensis* (afetando a América do Sul) (Torres-Guerrero, 2017, IAMAT, 2016). Apesar de ocasionar principalmente a forma cutânea da doença, já foi demonstrado que a *Leishmania (L.) amazonensis* também pode levar a forma visceral (Barral *et. al.*, 1991). Além disso, já foi relatada a ocorrência de leishmaniose visceral causada por *Leishmania (L.) amazonensis* em cães que são o principal reservatório zoonótico de leishmaniose visceral (Tolezano, 2007). Para cães, foi elaborada uma vacina (LeishTec®), porém ainda é restrita às espécies: *Leishmania (L.) infantum chagasi*, *Leishmania (L.) donovani*, *Leishmania (L.) infantum*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) mexicana* e tem a eficácia entre 95% e 96%, ou seja, não protege totalmente a população canina (Rezvan, 2015 e ARCA, 2014).

Importante mencionar que ainda não há vacinas disponíveis para prevenção da doença em seres humanos. Além disso, o tratamento ainda é bastante restrito já que há poucos medicamentos disponíveis no mercado. Os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ), conforme

preconizado pela Organização Mundial da Saúde e pelo Centro de Controle de Doenças (CDC - *Centers for disease control and prevention*). Além dos problemas com a segurança dos medicamentos (nefro e hepatotoxicidade elevada), o acesso é dificultado pela baixa comercialização, principalmente em países pobres que são vastamente atingidos pela parasitose. Além disso, os medicamentos utilizados no tratamento são relativamente caros, e nem sempre disponibilizados pelo governo, criando assim mais uma barreira para o tratamento populacional. No Brasil, apesar do Glucantime, um dos principais medicamentos, ser disponibilizado pelo SUS (Sistema único de Saúde), casos de resistência parasitária estão afetando o tratamento. Por isso, a busca por novos alvos moleculares, bem como o entendimento dos mecanismos de resistência e curso da infecção são essenciais para prevenção, tratamento adequado e erradicação da doença (WHO, 2010; IMAT, 2016, Ministério da Saúde, 2006 e Ministério da Saúde, 2007).

## **1.2 Resposta imunológica na leishmaniose**

Após entrada no hospedeiro mamífero, promastigotas de *Leishmania* já encontram as primeiras barreiras da resposta imunológica. A interação do parasita (*L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani*) com o sistema complemento do hospedeiro leva a sua ativação com a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) na superfície do patógeno, promovendo lise dos parasitas (Dominguez *et al.*, 2002). No entanto, *Leishmania* têm diversas estratégias de subverter essa resposta: o lipofosfoglicano (LPG) presente na superfície do parasita inibe a formação do MAC (Ramer-Tait *et al.*, 2012) enquanto que a glicoproteína de 63 KDa (GP63), também expressa na superfície do patógeno, converte C3b em iC3B (forma inativa) também inibindo a formação do MAC (Brittingham *et al.*, 1995). A opsonização dos parasitas com C3b e iC3b facilita sua captação por células fagocíticas via receptores específicos presentes em neutrófilos e macrófagos, por exemplo (Gurung e Kanneganti, 2015). As moléculas LPG e GP63 também podem atuar para a sobrevivência do parasita no interior de macrófagos. Nos estágios iniciais de infecção LPG inibe a fusão dos fagossomos que contém os parasitas com os lisossomos e GP63 inibe as enzimas

degradativas do fagolisossoma, protegendo assim o parasita (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

A captação dos parasitas por células fagocíticas é passo importante para o estabelecimento da infecção. As principais células que respondem a infecção por *Leishmania* são os neutrófilos e macrófagos. Essas células apresentam receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos que reconhecem o parasita e ativam uma cascata de sinalização que leva ativação da célula e a produção de diversos fatores microbicidas, promovendo a morte do parasita (Thomas e Schroder, 2013 e Kumar *et al.*, 2011). Os receptores TLR2 e TLR4 presentes nos macrófagos reconhecem o parasita no ambiente extracelular enquanto TLR3 e TLR9 reconhecem *Leishmania* no vacúolo. A ativação dos TLRs leva a sinalização intracelular que culmina na ativação da célula (Gurung e Kanneganti, 2015). No citoplasma, *Leishmania* ativa o inflamassoma NLRP3, o qual leva a produção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18, que exercem diversas funções celulares, especialmente relacionadas à inflamação (Lima-Junior *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2003).

Macrófagos e neutrófilos parecem exercer papéis distintos no curso da infecção por *Leishmania* (Liévin-Le Moal *et al.*, 2016). Após a infecção inicial, essas células são recrutadas para o sítio da infecção e sua interação com os parasitas influencia o resultado da infecção (Liu e Uzonza, 2012). Além do reconhecimento do patógeno via receptores da imunidade inata, neutrófilos podem eliminar os parasitas por meio dos seguintes mecanismos: fagocitose, degranulação e liberação de redes extracelulares (NETs) contendo DNA, histonas e proteínas as quais são tóxicas para *Leishmania* (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009). A liberação das NETs é um tipo de morte celular dos neutrófilos denominada NETosis, o qual é estimulada por componentes do parasita, como LPG e GP63 (Abdallah e Denkers, 2012; Gabriel *et al.*, 2010). Já foi demonstrada a formação de NETs para as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. major*, *L. chagasi* (Guimarães-Costa *et al.*, 2009) e *L. donovani* (Gabriel *et al.*, 2010). *Leishmania* pode escapar das NETs pela atividade enzimática de nucleotidases/nucleases presentes na membrana plasmática, que lisam as NETs e, assim, medeiam a resistência do parasita (Guimarães-Costa *et al.*, 2014). Neutrófilos podem também influenciar o microambiente inflamatório e o desenvolvimento de imunidade protetora pela produção de

citocinas e mediadores inflamatórios que podem interagir em diferentes tipos celulares, como células dendríticas (DCs), macrófagos, células *Natural Killer* (NK), linfócitos T e B (Puga *et al.*, 2012; Schuster *et al.*, 2013; Silva, 2011; Constantini e Cassatela, 2011; Kalyan e Kabelitz, 2014). Contudo, neutrófilos apoptóticos podem suprimir a ativação de DCs e macrófagos, favorecendo a infecção (Savill *et al.*, 2002; van Zandbergen *et al.*, 2004). Assim, o papel dessas células na imunidade para *Leishmania* ainda é controverso e parece estar ligada a espécie do parasita e a base genética do hospedeiro.

DCs orquestram a ativação e diferenciação de células T e por isso funcionam como importante ligação entre a imunidade inata e a adaptativa (Banchereau e Steinman, 1998). O reconhecimento de antígenos expressos pelo parasita por receptores presentes nas DCs estimulam a resposta dessas células que, adequadamente ativadas, são capazes de estimular resposta imunológica adaptativa protetora. A produção de IL-12 por essas células induz a diferenciação de linfócitos T no subtipo Th1, o qual tem resposta protetora contra leishmaniose (Chaudhary *et al.*, 2014). Contudo, algumas espécies de *Leishmania*, como *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis*, conseguem subverter as funções das DCs, promovendo ativação inadequada dessas células e consequentemente prejudicando a resposta de células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Bennett *et al.*, 2001; Xin *et al.*, 2008).

Macrófagos são as principais células hospedeiras de *Leishmania*. O contato inicial entre o parasita e macrófagos permite a modulação da atividade fagocítica dessas células (Rotureau *et al.*, 2009). Os diversos receptores envolvidos com o processo de fagocitose participam de maneira diferente do curso da infecção. Interação com receptores para o complemento promovem condições favoráveis para a sobrevivência do parasita enquanto que as interações com receptores para fibronectina, manose e Fc medeiam a ativação de vias inflamatórias que resultam na ativação da NADPH oxidase e no *burst* respiratório, resultando na morte do parasita (Ueno e Wilson *et al.*, 2012). Outros receptores, como TLR2, são muito importantes para ativação dos macrófagos. Esses receptores induzem a expressão das moléculas SOCS-1 e SOCS-3 que ativam fortemente os macrófagos, controlando os perfis de M1 e M2 (Aldridge e Vogel, 2014).

Os dois principais mecanismos de controle do parasita pelos macrófagos são a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerado pelo *burst* respiratório que ocorre durante o processo de fagocitose, e a produção de óxido nítrico (NO), gerado a partir da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Scott e Novais, 2016). ROS apresentam efeitos tóxicos diretos sobre o parasita e efeitos indiretos. ROS induzem ativação do inflamassoma NLRP3 que leva a liberação da citocina pró-inflamatória IL-1, a qual induz diretamente a produção de NO e indiretamente produção de IL-12 por macrófagos (Lima-Junior *et al.*, 2013; Scott e Novais, 2016). Além disso, macrófagos são altamente sensíveis as citocinas IFN- $\gamma$  (produzido principalmente por células Th1) e TNF- $\alpha$ , as quais podem agir sinergicamente para promover intensa ativação dessas células culminando com a eliminação do parasita pela produção de NO (Bogdan, *et al.*, 1990).

Diversas estratégias foram desenvolvidas pelo parasita para impedir a ativação efetiva de macrófagos, como por exemplo: invasão silenciosa por meio da ligação a receptores não desencadeantes de repostas inflamatórias, como CR1 e fosfatidilserina; supressão da produção interleucina 12 (IL-12) e da ativação de fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B), redução da expressão de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II por células apresentadoras de antígenos (APCs); além da indução da produção de citocinas reguladoras, como IL-10 e Fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) (Nylén e Gautam, 2010). Além dessas, a espécie *L. (L.) amazonensis* é capaz de induzir em macrófagos a formação de vacúolos parasitóforos grandes que podem servir de barreira e diluir os efeitos microbicidas do NO e de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células infectadas (Wilson *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que componentes da própria *L. (L.) amazonensis* podem inibir a ativação e função efetora de macrófagos e células dendríticas (Soong, 2012).

Infecção por *L. (L.) amazonensis* (Lainson e Shaw, 1972) pode resultar em variabilidade de casos clínicos, passando pelos quatro tipos de formas, desde sua forma mais comum, cutânea, como também nas formas mucocutânea, difusa e mais raramente na forma visceral. Essa espécie de parasita apresenta características peculiares no que refere as



respostas evasoras. Esses parasitas podem induzir o retardo da resposta imunológica do hospedeiro com a supressão da resposta imune. As células imunológicas imaturas (principalmente macrófagos) que estão sendo recrutadas ao local de infecção não são ativadas, desta maneira os parasitas podem, rapidamente, multiplicam-se no interior celular e estabelecer a infecção logo nos estágios iniciais e favorecer sua permanência nos estágios tardios (Chang *et.al*, 2003). Além disso, essa espécie ainda pode promover a redução da ativação de linfócitos CD4<sup>+</sup> pelo sequestro e degradação da molécula de MHC II em macrófagos (Lang, 1994 e Leao, 1995), bloquear a produção de NO nas células hospedeiras (Balestieri, 2002), além de manter a acidez nos vacúolos parasitóforos como um meio de proteção e sobrevivência do parasita (Antoine, 1990).

Tendo visto a interação parasita-hospedeiro, a ativação adequada de macrófagos parece ser a chave para o controle da leishmaniose. Porém, estas células são influenciadas tanto pelo parasita quanto por diferentes componentes da resposta imunológica. Após estímulo, macrófagos podem se diferenciar em dois fenótipos distintos: M1, cuja diferenciação é induzida por interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e outras citocinas pró-inflamatórias, e M2, o qual é induzido por diversas citocinas, como interleucina 4 (IL-4) e IL-10 (Mosser e Edwards, 2008; Martinez *et al.*, 2009). Macrófagos M1 são importantes para o controle da infecção por *Leishmania* uma vez que aumentam a produção de óxido nítrico (NO) e outras substâncias tóxicas para o parasita. Por outro lado, macrófagos M2 são mais permissivos a replicação de parasitas intracelulares. Portanto, a indução do fenótipo M2 leva a claras vantagens para *Leishmania* (Pinheiro e Rossi-Bergmann, 2007).

Quanto à resposta imune adaptativa, de maneira geral, a resistência à infecção por *Leishmania* tem sido associada à indução do subgrupo de células efetoras Th1 e a susceptibilidade a presença de células do Th2. A produção de IL-12 por DCs é fundamental para a diferenciação de Th1, uma das principais fontes de IFN- $\gamma$ . No entanto, as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF também podem estar relacionadas à patogênese da doença, já que pacientes com a forma mais grave doença apresentam altos níveis dessas citocinas (Bacellar *et al.*, 2002; Melby *et al.*, 1994).

Embora o curso da resposta imunológica na leishmaniose vem sendo desvendado, o papel de algumas células (como células B-1) ainda tem sido negligenciado. Estudar a importância dessas células e suas diversas formas de interação com outras células e com a resposta imunológica é fundamental para entender melhor a relação entre parasita e hospedeiro nessa importante doença negligenciada.

### 1.3 Células B-1

Células B-1, também chamadas de linfócitos B inatos, são um subtipo de linfócitos B que apresentam características muito peculiares e distintas quando comparadas aos linfócitos B-2 (linfócitos B convencionais). Células B-1 e B-2 divergem em relação ontogenia, localização anatômica, repertório de anticorpos, estimulação pelo antígeno e papel na resposta imunológica (Popi *et al.*, 2016). Fenotipicamente, células B-1 apresentam expressão de CD19, marcador de células B-2, mas diferem dessas células por apresentarem expressão não usual de marcadores de superfície ( $\text{IgM}^{\text{high}} \text{IgD}^{\text{low}} \text{CD11b}^+$ ) e ausência (ou baixa expressão) do marcador CD23 (Berland e Wortis, 2002; Hardy e Hayakawa, 2001). As células B-1 ainda são subdivididas em B-1a e B-1b pela presença ou ausência da molécula de CD5 (marcador de linfócitos T), respectivamente (Herzenberg 2000; Herzenberg *et al.*, 1986). Quanto à localização anatômica, células B-1 são predominantes nas cavidades peritoneal, pleural e raras no baço e linfonodos de camundongos adultos (Kipps, 1989; Hayakawa *et al.*, 1986; Marcos *et al.*, 1994). Sobre a ontogenia, células B-1 originam-se durante o desenvolvimento fetal a partir de precursores distintos daqueles das células B-2 presentes no baço (Ghosn *et al.*, 2012).

Além dessas diferenças, células B-1 apresentam papel distinto na imunidade. Células B-1 são as principais produtoras de anticorpos naturais (Berland e Wortis 2002), são grandes produtoras de IL-10 (O'Garra *et al.*, 1992), podem migrar para foco inflamatório (Bogsan *et al.*, 2005), são capazes de se diferenciar em fagócitos mononucleares (Almeida *et al.*, 2001; Popi *et al.*, 2012) e modular a resposta imune em diversos modelos experimentais (Popi *et al.*, 2008; Minoprio *et al.*, 1993; Herbert *et al.*, 2002). Contudo, o papel dessas células na patogênese

de diversas doenças, assim como sua influência sobre outras células do sistema imune, ainda é pouco compreendido.

Modelos experimentais têm ajudado a entender melhor o papel de células B-1. Em modelo de paracoccidiodomicose experimental, camundongos XID (geneticamente desprovidos de células B-1) intratraquealmente infectados pelo fungo apresentaram menor número de colônias (CFU) no pulmão que camundongos *wild type* (selvagem). A transferência de células B-1 para camundongos XID diminuiu sua sobrevivência após infecção pelo fungo. *In vitro*, a presença de células B-1 diminuiu a fagocitose de *Paracoccidioides brasiliensis* por macrófagos e GP43, a principal glicoproteína produzida pelo fungo, estimulou a produção de IL-10 por células B-1 (Popi *et al.*, 2008). Minoprio *et al.* (1993) demonstraram que na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* ocorreu aumento significativo de células B-1 esplênicas na fase aguda da doença e, ainda, camundongos XID resolveram com maior eficiência a infecção por esse protozoário. Por outro lado, camundongos XID foram susceptíveis à infecção por *Strongyloides stercoralis* (Herbert *et al.*, 2002) e *Schistosoma mansoni* (Gaubert *et al.*, 1999). Estes dados sugerem que células B-1 podem participar da resistência ou da susceptibilidade a determinada infecção dependendo das características do patógeno.

Para leishmanioses os dados da literatura ainda são escassos e controversos. Hoerauf *et al.* (1994) mostraram que camundongos XID foram mais resistentes à infecção por *L. (L.) major* quando comparados a camundongos BALB/c infectados. Porém, outros autores demonstraram que camundongos BALB/c depletados de células B-1 por irradiação desenvolveram doença mais grave que os animais controle (Babai *et al.*, 1999), sugerindo que células B-1 não contribuem para susceptibilidade a *L. (L.) major* em camundongos BALB/c. Nosso grupo demonstrou que animais XID foram mais resistentes à infecção por *L. (L.) chagasi* em mecanismo que envolve a participação da IL-10 (Gonzaga *et al.*, 2015). Por outro lado, camundongos XID foram mais susceptíveis à infecção por *L. (L.) amazonensis*, sugerindo que células B-1 podem modular a resposta imunológica na infecção experimental por essas duas espécies de *Leishmania*, contribuindo para distintos perfis de resistência e susceptibilidade (Gonzaga *et al.*, 2017).

Estudos *in vitro* têm contribuído para a melhor compreensão dos mecanismos pelos quais células B-1 podem contribuir para a imunidade. Células B-1 diferenciadas em fagócitos (B-1 CDP) internalizaram *in vitro* *Coxiella burnetti* (Popi *et al.*, 2009) e leveduras de *Cryptococcus neoformans* (Ghosn *et al.*, 2006). Células B-1 peritoneais foram capazes de fagocitar *in vivo* *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e timócitos apoptóticos (Gao *et al.*, 2012; Novaes e Brito *et al.*, 2010). Para *Leishmania*, também foi demonstrado que células B-1 foram capazes de fagocitar *in vitro* promastigotas de *L. (L.) major* (Arcanjo *et al.*, 2015) e nosso grupo demonstrou que células B-1 também fagocitaram *in vitro* e *in vivo* promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Geraldo *et al.*, 2016). Após a fagocitose *in vivo* de *L. (L.) amazonensis*, células B-1 aumentaram a expressão das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  (Geraldo *et al.*, 2016).

Mesmo com os avanços nos estudos sobre células B-1, há poucos trabalhos que mostram a interação dessas células com outras células do sistema imunológico. Células B-1 mostraram capacidade de apresentação de antígeno e de polarização de células T preferencialmente para perfil Th17 (Popi *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2007). Wong *et al.* (2010) mostraram que células B-1 podem influenciar a polarização de macrófagos para um perfil M2-like por mecanismo dependente de IL-10 produzida pelas células B-1. Popi *et al.* (2004) também demonstraram que IL-10 produzida pelas células B-1 levaram a diminuição da capacidade fagocítica, produção de NO e de espécies reativas a oxigênio (ROS) por macrófagos peritoniais. Resultados similares foram encontrados em macrófagos peritoniais infectados por *L. (L.) major*, no qual a presença de células B-1 estimulou macrófagos a produzirem IL-10 e corpos lipídicos, favorecendo o crescimento intracelular do parasita (Arcanjo *et al.*, 2017).

Interessante notar que a maioria dos trabalhos mostra que células B-1 podem modular a resposta de outras células do sistema imunológico por contato direto (via apresentação de antígeno) ou pela produção e liberação de citocinas e anticorpos. Por outro lado, ainda não foram publicados dados sobre a produção e liberação de vesículas extracelulares produzidas por células B-1, bem como seu papel na modulação de outras células do sistema imunológico.

## 1.4 Comunicação por Vesículas Extracelulares (EVs)

Macrófagos e outras células do sistema imunológico realizam complexa comunicação intercelular mediada por via contato célula-célula (como, por exemplo, na sinapse imunológica mediada pelas várias moléculas envolvidas na apresentação de antígeno), por citocinas e/ou por intermediação de vesículas extracelulares (EVs). O estudo da comunicação entre as células do sistema imunológico por EVs é relativamente recente, porém vários trabalhos mostraram que EVs liberadas por células ativadas podem agir como mensageiras carregando mediadores e sinais de uma célula a outra (Wang *et al.*, 2011; Oehmcke *et al.*, 2012).

Vesículas extracelulares são nanopartículas envoltas por bicamada lipídica, liberadas por bactérias e células eucarióticas e que carregam diferentes biomoléculas em seu interior e superfície, como: proteínas, lipídeos, RNA-m e microRNA. As vesículas funcionam como mensageiras, transferindo informações e garantindo a comunicação celular até mesmo a longa distância (Théry *et al.*, 2002). O efeito biológico das EVs na célula receptora dependerá da natureza e da composição dessas EVs. Atualmente, as EVs podem ser amplamente classificadas em três classes principais dependendo da sua origem intracelular e da sua composição: (I) microvesículas (100 a 1000 nm), as quais são liberadas a partir da membrana plasmática; (II) exossomos (20 a 100 nm), formados a partir de invaginações da membrana endossomal em processo que permite a incorporação de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e açúcares incorporados nas porções interiores e superficiais destas partículas; (III) corpos apoptóticos (> 1000 nm), liberados das células que estão em apoptose (Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

Vários trabalhos demonstraram que agentes infecciosos podem influenciar a composição das EVs liberadas por células do sistema imune e assim influenciar o curso da resposta imunológica. Células B infectadas com o vírus Epstein-Barr liberaram EVs contendo complexos peptídeo-MHC classe II que foram capazes de ativar células T CD4<sup>+</sup> *naive* (Raposo *et al.*, 1996). Outros trabalhos também demonstraram que DCs podem produzir vesículas extracelulares carregando complexos peptídeo-MHC classe I ou II, que podem ser diretamente

reconhecidos por células T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> ou ainda podem ser capturados por outras células dendríticas para apresentação de antígeno (Zitvogel *et al.*, 1998).

Macrófagos infectados podem alterar o conteúdo das EVs incorporando moléculas do patógeno que podem modular a resposta de macrófagos residentes (Bhatnagar *et al.*, 2007; O'Neill e Quah, 2008). Macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* liberaram EVs contendo produtos da parede celular da micobactéria (Singh *et al.*, 2012). Dados similares foram obtidos por macrófagos infectados por *Leishmania* nos quais as EVs liberadas continham GP63 (Hassani e Olivier, 2013). Macrófagos murinos infectados por patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, ou *Toxoplasma gondii*, produziram vesículas extracelulares que estimularam resposta pró-inflamatória em macrófagos não infectados. As vesículas liberadas por macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* estimularam produção de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-12, além de promover recrutamento tanto de macrófagos como neutrófilos em camundongos não infectados (Bhatnagar *et al.*, 2007). Dados similares foram encontrados em macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis*, os quais produziram EVs que promoveram a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e TNF- $\alpha$  em macrófagos não infectados (Cronemberger-Andrade *et al.*, 2014). Esses dados demonstram claramente que EVs produzidas pelas células do sistema imunológico podem atuar juntamente com citocinas e quimiocinas influenciando o curso da resposta imunológica (Zhang *et al.*, 2014).

Assim, entender melhor como EVs de diferentes células do sistema imune funcionam para regular a imunidade pode resultar em informações importantes que poderão ser usadas para o melhor entendimento da resposta imunológica e da patogênese de diversas doenças. Portanto, é importante caracterizar e estudar a função dessas vesículas em diversas células do sistema imunológico, em especial naquelas em que ainda não foram estudadas, como as células B-1.

## 2. OBJETIVOS

Caracterizar morfológicamente e funcionalmente as EVs liberadas pelas células B-1 na presença ou ausência de infecção *in vitro* por *L. (L.) amazonensis*. Avaliar a influência das EVs provenientes de células B-1 infectadas ou não com o parasita sobre a ativação de macrófagos.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar e caracterizar por *Nano Tracking analysis* (NTA) e microscopia eletrônica as EVs liberadas por células B-1 estimuladas ou não com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- Estudar a expressão de moléculas MHC II, co-estimuladoras e marcadores de células B-1 em EVs liberadas por células B-1 infectadas ou não com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- Estudar a influência de EVs produzidas por células B-1 na produção de citocinas, fagocitose, expressão de iNOS e arginase em diferentes linhagens de macrófagos, a saber: linhagem J774A.1 (macrófagos imortalizados), macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c e C57BL/6.
- Avaliar *in vivo* o papel de vesículas extracelulares de células B-1 infectadas no curso da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Soluções

- **Solução estoque de tampão fosfato-salina (PBS):** NaCl 2,7378 M, KCl 0,053 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1301 M e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,0229 M. Para uso, esta solução foi diluída 20X (PBS 1X).
- **Tris borato EDTA (TBE):** Tris-base 0,45 M,  $\text{H}_3\text{PO}_3$  0,44 M, EDTA 0,5 M. Para uso, esta solução foi diluída 5X (TBE 1X).
- **MACS:** PBS 1X, EDTA 20 mM, 0,5% de albumina bovina sérica (BSA).
- **PBS-Tween:** PBS 1X, 0,05% de Tween 20.
- **Solução de bloqueio (ELISA citocinas):** PBS 1X acrescido de 1% de BSA.

#### 3.2 Meios de cultura

- **Meio 199 (Gibco):** hepes 40 mM, adenina 1 mM, bicarbonato de sódio 4,2 mM, hemina em pó 5 mg.L<sup>-1</sup>. Os componentes foram dissolvidos em água milliQ e o pH foi ajustado entre 7,2 e 7,4. O meio foi filtrado em membranas de 0,22 µm (Millipore).
- **Meio 199 completo:** meio 199 acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas).
- **Meio RPMI:** RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) acrescido de ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico 10mM (HEPES), bicarbonato de sódio 24 mM.
- **Meio R-10:** RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB e solução antibiótica de estreptomicina e penicilina (100 unidades.mL<sup>-1</sup> de cada antibiótico) (Thermo Fisher, Gibco, USA).
- **Meio R-10 livre de exossomos:** RPMI acrescido de 10% de SFB ultracentrifugado a 100.000 g por oito horas e solução antibiótica de estreptomicina e penicilina (100 unidades/mL de cada antibiótico).
- **Primeiro meio L929:** 50% de sobrenadante de cultura de células L929, 30% RPMI,



20% de SFB.

- **Segundo meio L929:** 30% de sobrenadante de cultura de células L929, 50% RPMI, 20% de SFB.

### 3.3 Animais

Camundongos fêmeos da linhagem BALB/c e C57BL/6 foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP e mantidos no Biotério Central do Campus Diadema. Os animais foram tratados conforme recomendação do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), Resolução Normativa, Nº 33, novembro de 2016. A eutanásia dos animais foi realizada por excesso de anestésico (halotano 3 – 5 %) mantendo até a parada cardiorrespiratória. A utilização de camundongos fêmeos é devida a maior população de células B-1 peritoneais e a escolha de comparação entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 é devida aos perfis de suscetibilidade e resistência, respectivamente, aos parasitas do gênero *Leishmania*.

### 3.4 Parasitas

A cepa MHOM/BR/1973/M2269 de *L. (L.) amazonensis* foi, gentilmente, cedida pela Dra. Clara Lúcia Barbieri da Disciplina de Parasitologia da UNIFESP. Os promastigotas foram mantidos em cultivo *in vitro* com meio 199 acrescido de 10% de SFB.

### 3.5 Congelamento e descongelamento de parasitas

O congelamento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi realizado em meio de congelamento contendo 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - Merck S.A.). Os parasitas coletados da garrafa de cultura foram transferidos para tubos de 15 mL (Costar Corp, Cambridge, MA) e centrifugados a 4.200 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os parasitas ressuspensos em meio de congelamento. Cada alíquota de 1 mL

contendo  $1 \times 10^8$  de parasitas foi estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O descongelamento dos parasitas foi efetuado em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , transferindo-os imediatamente para tubos falcon de 15 mL e diluindo-se gota a gota em 9 mL de meio 199 completo. Os tubos foram então centrifugados a 4.200 rpm por 15 minutos. Após o descarte do sobrenadante, os parasitas foram ressuspensos em 10 mL de meio 199 completo e transferidos para garrafas de cultura de  $25 \text{ cm}^2$  (Costar).

### **3.6 Cultura de promastigotas de *L. (L.) amazonensis***

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram descongeladas e cultivadas em garrafas de cultura pequenas ( $25 \text{ cm}^2$ ) contendo meio 199 completo e mantidas a temperatura controlada de  $26^{\circ}\text{C}$ . Após cinco dias de cultura, os parasitas foram transferidos para garrafas de cultura médias ( $75 \text{ cm}^2$ ) e mantidos sob as mesmas condições até se obter a fase estacionária de crescimento (Paladi *et al.*, 2012).

### **3.7 Congelamento e descongelamento de macrófagos de linhagem J774A.1 e fibroblastos L929**

O congelamento de células de ambas as linhagens foi realizado em meio de congelamento contendo 90% de SFB e 10% de DMSO. As células coletadas da garrafa de cultura foram transferidas para tubos de 15 mL (Costar Corp, Cambridge, MA) e centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio de congelamento. Cada alíquota de 1 mL contendo  $2 \times 10^6$  células foi estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O descongelamento das células foi efetuado em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , transferindo-as imediatamente para tubos de 15 mL e diluindo-se gota a gota em 9 mL de meio R-10. As células foram então centrifugadas a 1.200 rpm por cinco minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio R-10 e transferidas para garrafas de cultura de  $25 \text{ cm}^2$  (Costar).

### **3.8 Cultura de macrófagos de linhagem J774A.1**

As células foram mantidas conforme preconizado pela ATCC (<http://www.atcc.org/products/all/TIB-67.aspx#culturemethod>), com algumas modificações. Após descongelamento, as células foram cultivadas em garrafas de cultura pequenas contendo meio R-10 e mantidas sob atmosfera úmida, a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após três dias de cultura foi realizada a troca do meio de cultura. Para efetuar o repique celular, as células foram mantidas sob as mesmas condições até se obter a confluência de 90% na garrafa. As células foram desaderidas mecanicamente e transferidas para tubo de 15 mL. Após centrifugação a 1.200 rpm por cinco minutos, as células foram ressuspensas em 20 mL de meio R-10 e por fim transferidas para uma garrafa de cultura média (75 cm<sup>2</sup>).

### **3.9 Obtenção de sobrenadante de células da linhagem de fibroblastos L929**

As células L929 foram descongeladas e cultivadas em garrafas de cultura pequenas (25 cm<sup>2</sup>) em meio R-10 sob atmosfera úmida a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após três dias de cultura, as células foram transferidas para garrafas de cultura médias (75 cm<sup>2</sup>) e após mais 3 dias, repicadas para garrafas de culturas grandes (125 cm<sup>2</sup>). Depois de 3 dias, o sobrenadante foi recolhido e congelado, e as células repicadas novamente para a garrafa grande. O segundo sobrenadante foi recolhido e congelado e as células transferidas para garrafas pequenas. Esse processo foi repetido diversas vezes para obtenção de quantidade suficiente de sobrenadante L929 para realização de todos os experimentos. Cabe aqui dizer que o sobrenadante das células L929 contém M-CSF, um fator que induz a diferenciação de células da medula óssea em macrófagos, denominados macrófagos medulares.

### **3.10 Obtenção e cultivo de macrófagos de origem medular**

Macrófagos medulares foram obtidos a partir da diferenciação de células da medula óssea de acordo com Zamboni e Rabinovitch (2003), com modificações. Resumidamente, fêmures de camundongos BALB/c e C57BL/6 foram retirados e com auxílio de seringa e

agulha as medulas ósseas foram lavadas para a retirada de suas células. As células medulares foram coletadas e centrifugadas a 1.200 rpm por cinco minutos, ressuspensas no meio contendo 50% de sobrenadante de cultura de células L929 (obtenção do sobrenadante descrito no item 3.9), 30% RPMI, 20% SFB e mantidas em estufa úmida a 37°C em 5 % de CO<sub>2</sub> por 72 h. No terceiro dia, o sobrenadante foi retirado e as células foram colocadas no meio contendo 30% de sobrenadante de cultura de células L929, 50% RPMI, 20% SFB. As células permaneceram na estufa por mais 72 h e após este período a troca do meio foi repetida. Ao final de 10 dias, foi adicionado meio R-10 (10% SFB e 90% RPMI). Regularmente, os macrófagos foram marcados com anti-F4/80 (conjugados a PerCP) para citometria de fluxo (FACS) para avaliação da diferenciação.

### 3.11 Obtenção e purificação de células B-1 peritoneais

As células B-1 foram obtidas por lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6. As células peritoneais totais foram submetidas à marcação e purificação para obtenção de cultura enriquecida de células B-1. Para tanto, células do lavado peritoneal foram centrifugadas por 1.200 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as células foi ressuspendido em tampão MACS (PBS 1X, EDTA 20 mM, 0,5% de SFB), na proporção 80 µL para cada 10<sup>7</sup> de células. As células foram primeiramente incubadas por 15 minutos com anti-receptor Fc – anti-Fc *block* (Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32; Mouse BD Fc Block™) e depois lavadas com 500 µL de tampão MACS. Após, as células totais foram incubadas por 15 minutos com anti-CD23 *microbeads* (anticorpo MACS Multeneyi Biotec) e transferidas para as colunas magnéticas para seleção negativa. Posteriormente, células CD23<sup>-</sup> foram centrifugadas a 1.200 rpm por cinco minutos e depois ressuspensas em tampão MACS (80 µL para cada 10<sup>7</sup> células). Sequencialmente, as células CD23<sup>-</sup> foram incubadas por 15 minutos com anti-CD19 *microbeads* (anticorpo MACS Multeneyi Biotec) para a seleção positiva. Células CD19<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup> foram retidas na coluna magnética e depois eluídas com 5 mL de tampão MACS, estas foram consideradas como células B-1 purificadas (De Lorenzo *et al.*, 2007).

### 3.12 Avaliação da população de células B-1 por citometria de fluxo

Análises de citometria de fluxo foram realizadas para avaliar a porcentagem de pureza das células B-1 purificadas por colunas magnéticas. Para tanto, células B-1 purificadas foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD11b conjugado com ficoeritrina (PE), anti-IgM conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Resumidamente, células provenientes de lavado peritoneal foram coletadas, lavadas com PBS (1X) e purificadas conforme descrito no item (3.10). Após a purificação, a concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células por tubo, cada amostra foi incubada por 15 minutos com anti-Fc *block* e após lavagens as células foram incubadas por mais 30 minutos no gelo com os marcadores acima descritos. Depois da incubação, as células foram lavadas com PBS (1X) e a população marcada adquirida em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD). Um total de 10.000 eventos do *gate* de linfócitos foi contado e os dados das marcações adquiridos. A análise dos dados adquiridos foi realizada utilizando o software FlowJo.

### 3.13 Ensaio de infecção *in vitro* de células B-1

Os ensaios foram realizados com células peritoneais (descrito no item 3.11) que foram purificadas por colunas magnéticas para obtenção de células B-1. Aproximadamente,  $1 \times 10^6$  células B-1 purificadas foram plaqueadas por poço em placas de cultura de 24 poços. Importante mencionar que nestes casos sempre foram utilizados meio R-10 ultracentrifugado (livre de vesículas extracelulares). Após duas horas, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram adicionadas na MOI de 5 (*multiplicity of infection* - multiplicidade da infecção). Células B-1 não infectadas foram usadas como controle. Posteriormente, as células foram mantidas em cultura por 24 ou 48 horas. Os sobrenadantes foram coletados para purificação de vesículas extracelulares. Para um rendimento adequado de amostras, pelo menos  $5 \times 10^6$  (cinco poços) de células foram utilizadas tanto para o controle (obtenção de EVs de células B-1 não infectadas) como para a amostra infectada (obtenção de EVs de células B-1

infectadas).

### **3.14 Coloração por iodeto de propídeo (PI)**

A viabilidade das células B-1 (obtidas e purificadas conforme o item 3.11) foi avaliada após a infecção por promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, durante 24 e 48 horas (conforme descrito no item 3.13). Transcorrido o tempo de co-cultura com o parasita de 24 ou 48 horas, as células foram marcadas com PI (marcador de morte celular). Para isso, foi acrescentado 1 µL da solução de iodeto de propídeo na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Após 15 minutos a temperatura ambiente, as células foram novamente lavadas e observadas no microscópio de fluorescência.

### **3.15 Obtenção de EVs liberadas por células B-1**

Após a coleta dos sobrenadantes das células infectadas e não infectadas (controle), as amostras foram submetidas a diferentes etapas de centrifugação: (1) centrifugação de 500 *g* por 10 minutos para retiradas das células e parasitas.; (2) o sobrenadante de (1) foi centrifugado a 1.500 *g* por 10 minutos; (3) o sobrenadante de (2) foi então centrifugado a 10.000 *g* por 10 minutos (para a remoção de células e debris celulares); (4) o sobrenadante de (3) foi submetido a uma centrifugação a 100.000 *g* por 1 h e 30 minutos e o pellet contendo as vesículas foi ressuspensionado em PBS e novamente centrifugado a 100.000 *g* por 1 h e 30 minutos (ultracentrífuga Sorvall WX Ultra Thermo Scientifi - rotor T890). Ao final o *pellet* contendo as vesículas extracelulares foi ressuspensionado em PBS 1X filtrado e armazenado a -20°C até sua utilização.

### **3.16 Determinação da concentração e tamanho das vesículas por aparelho medidor de partículas**

As vesículas extracelulares purificadas de células B-1 (descrito em 3.15) foram diluídas 10X em PBS (1X) e avaliadas quanto ao tamanho e concentração no equipamento Nanosight

(NS300 Malvern™). Foram realizadas três capturas com um minuto de duração (20 frames por segundo) sob temperatura de 20 °C. O equipamento utilizado encontra-se alocado na Disciplina de Nefrologia, Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

### 3.17 Dosagem proteica

A concentração proteica das vesículas foi avaliada pelo método do microBCA (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Fisher), seguindo as informações do fabricante. Primeiramente, foi realizada diluição seriada do padrão albumina sérica bovina (BSA) em concentrações que variaram de 0,5-200 µg.mL<sup>-1</sup>, em placas de 96 poços, para a obtenção da curva padrão. Para o branco, dois poços foram preparados apenas com o diluente. Após preparação da curva, as amostras a serem dosadas foram diluídas 10 X em PBS (1X), acrescidas de SDS 10% e depois adicionadas à placa. A placa foi incubada com os reagentes A, B e C próprio do *kit* (nas proporções 25, 24 e 1 parte em um total de 50 partes, respectivamente) período de 2 h a 37°C. Logo após o período de incubação, a densidade óptica (D.O.) foi avaliada em leitor de ELISA (Biotrek) no comprimento de onda de 562 nm. As densidades ópticas geradas permitiram a construção da curva padrão e o cálculo da equação da reta para posterior quantificação das proteínas nas amostras.

### 3.18 Microscopia eletrônica de varredura das vesículas extracelulares

Para realizar a microscopia eletrônica de varredura, seguimos o protocolo padronizado pela profa. Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas (Nogueira *et al.*, 2015). Primeiramente, lamínulas circulares foram limpas com álcool 70%, autoclavadas, adicionadas em placas de 24 poços e mantidas no fluxo laminar sob luz UV por 15 minutos. Depois, as lamínulas foram tratadas com Poli-L-Lisina para a total aderência das células. Para tanto, a solução de poli-L-lisina foi preparada diluindo a solução concentrada em PBS (1X) na razão 1:2 (100 µL de cada solução para cada poço). A poli-L-lisina, utilizada para a aderência das amostras às lamínulas,

foi filtrada em filtro de 0,22 mm e adicionada 200 µL por poço. Os poços contendo as lamínulas com poli-L-lisina foram incubadas por 10 minutos, a solução foi retirada e as lamínulas lavadas com PBS (1X). Após secagem completa das lamínulas, procedeu-se o mesmo protocolo descrito para obtenção de vesículas extracelulares de 24 horas (item 3.12). Passado o tempo de infecção de 24 horas, a fixação das células foi realizada utilizando 300 µL de tampão de fosfato contendo 2,5% de glutaraldeído, em tampão cacodilato (0,1 M e pH 7,2) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas quatro lavagens em tampão cacodilato 0,1 M, as quais foram: 2 x 10 s, 1 x overnight e 1 x 10 s. Após as lavagens, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1 % em tampão cacodilato 0,1 M por 1 h. Depois, as amostras foram tratadas com ácido tânico 1% em água durante 30 s e novamente lavadas em água por 2 x 5 s. Ao final das lavagens, foi feita a desidratação em série gradual de etanol (50% - 2 x 10 s; 70% 1 x – 10 s e 1 X overnight; 90% - 2 x 10 s e 100% - 3 x 10 s). Após, foi realizada a secagem no aparelho de ponto crítico usando CO<sub>2</sub>. Sendo finalizado, com a montagem no suporte porta-amostras do MEV (stub) usando Super Bond™ e recobrimo com ouro por *sputtering* (pulverização catódica) de 25 nm. As amostras foram visualizadas em microscópio de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo FEI Quanta 250. Todos os procedimentos de impregnação e análise das amostras foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da UNIFESP *campus* São Paulo.

### **3.19 Identificação e marcação de EVs de células B-1 por citometria de fluxo**

Inicialmente o anticorpo anti-MHCII-PE (BD) (ThermoFisher) foram centrifugados a 20.000 g por 30 minutos, em desaceleração em zero (sem freio) em volume final de 30 µL, para remoção de possíveis precipitados. A marcação das amostras foi realizada utilizando 5 x 10<sup>6</sup> EVs de células B-1 infectadas ou não com o parasita. As amostras foram incubadas por duas horas ao abrigo de luz e então adquiridas no citômetro de fluxo Cytotflex (Beckman). Um total de 10.000 eventos do *gate* de partículas de até 100 à 500 nm foi contado e os dados das marcações adquiridos. A análise dos dados adquiridos foi realizada utilizando o software FlowJo.



### 3.20 Tratamento de macrófagos com EVs de células B-1

Para avaliar o efeito das EVs de células B-1 na ativação de macrófagos, macrófagos de linhagem J774A.1 e macrófagos de origem medular das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 foram tratados com EVs provenientes de células B-1 infectadas ou não com os parasitas. Para realizar o tratamento dos macrófagos, as células foram plaqueadas na quantidade de  $2 \times 10^5$  por poço em placas de cultura de 24 poços e mantidas em cultura por 4 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para o tratamento foram utilizadas de 40 a 50 partículas por célula (ou aproximadamente 14 µg de massa proteica contidas nas EVs) a cada  $10^6$  células. Após o período, os macrófagos foram mantidos sob as mesmas condições por 48 horas. Após, o sobrenadante celular foi coletado para quantificação de citocinas (*kit* de ELISA) e as células usadas na extração de RNA total para avaliação da expressão gênica das citocinas e das enzimas iNOS e arginase.

### 3.21 Extração de RNA de macrófagos

Macrófagos da linhagem J774A.1 e de origem medular estimulados com EVs de células B-1 infectadas ou não com o parasita foram submetidos à extração de RNA. Para a extração, foi utilizado TRIzol® Reagent (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, para a lise celular, foi adicionado 1 mL de Trizol para cada  $1 \times 10^6$  células. O material foi transferido para microtubos e incubado a temperatura ambiente por cinco minutos. Posteriormente, para cada 1 mL de Trizol utilizado, foi adicionado 200 µL de clorofórmio. As amostras foram então incubadas por dois a três minutos a temperatura ambiente. Depois, as amostras foram submetidas à centrifugação a 15.000 g por 15 minutos a temperatura de 4°C. A fase aquosa foi transferida para novos tubos e foi adicionado 500 µL de isopropanol 100% a cada 1 mL de Trizol utilizado. O material foi novamente centrifugado a 15.000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado deixando apenas o *pellet* de RNA o qual foi lavado duas vezes com etanol 75%. Por fim, o *pellet* de

RNA foi seco a temperatura ambiente e depois re-hidratado com água ultrapura (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water). A dosagem do material foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop™) e as razões 260/280 e 260/230 avaliadas. Apenas amostras de RNA com as razões 260/280 nm e 260/230 nm entre 1,8–2,0 foram consideradas de boa qualidade. Além disso, a análise de integridade das amostras também foi avaliada por gel de agarose 1,5%.

### 3.22 Eletroforese em gel de agarose

A integridade de todas as amostras de RNA foi analisada em eletroforese em gel de agarose. Para tanto, foi realizado gel de agarose 1,5% (GE Healthcare) diluído em tampão TBE (1X) e acrescido de Gel Red (Biotium), agente intercalante de ácidos nucleicos, na proporção 1:100.000. A corrida foi realizada por aproximadamente uma hora à voltagem constante de 100 V. Após a corrida, o gel foi avaliado em luz UV para visualização das bandas de RNA. A imagem do gel foi adquirida em equipamento fotodocumentador (UVITEC, Cambridge). Somente amostras íntegras foram utilizadas para as análises de PCR em tempo real.

### 3.23 Tratamento com DNase

Após obtenção do RNA, para a remoção de possível contaminação com DNA genômico, as amostras que tiveram boa qualidade e estavam íntegras foram submetidas ao tratamento com DNase (Promega) (em quantidades idênticas de massa – dosagem realizada por Nanodrop™). Para o tratamento, foram seguidas as recomendações do fabricante. Primeiramente, as amostras foram tratadas com quantidades indicadas de DNase *Buffer* (tampão de DNase) e DNase livre de RNase do *kit* e depois foram incubadas a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos para inativação da DNase usando *Stop Solution* (solução de bloqueio) do *kit*.

### 3.24 Produção de cDNA

Para obtenção do cDNA, os procedimentos foram realizados com o *kit* ProtoScript® *First Stand* (New England BioLabs), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, após tratamento das amostras de RNA com DNase, foi preparado um *mix* de reação utilizando 6 µL de RNA tratado com DNase (em quantidades idênticas de massa), 2 µL de oligo(dt), este foi incubado a 70°C por cinco minutos. Após, foi adicionado 10 µL de Reaction Mix e 2 µL Enzyme Mix do *kit* e toda a solução foi incubada a 42°C por uma hora em equipamento termociclador (MasterCycler, Eppendorff). Após o último ciclo, a solução foi acrescida de 30 µL de água ultrapura (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water). O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

### 3.25 Análise quantitativa por PCR em tempo real

A PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real foi realizada com o reagente Sybr Green Power (Applied Biosystems). A partir da reação de transcrição reversa, utilizou-se 1 µL de cDNA, 5,0 µL de Power Sybr © Green PCR Master Mix (Thermo), 2,0 µL de cada oligonucleotídeo (1 µM): *forward* e *reverse* (Tabela 1). Para a amplificação do cDNA dos macrófagos medulares e de células B-1, foram utilizados os seguintes genes alvos: interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), arginase (ARG), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). As PCRs em tempo real foram realizadas utilizando equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 10 minutos a 50°C para ativação da enzima, desnaturação por cinco minutos a 95°C, e 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por um minuto. Após avaliar a qualidade da reação com base nas curvas de dissociação, os resultados foram analisados utilizando o programa StepOne *software* (Applied Biosystems). Foi usado o seguinte cálculo para a quantificação relativa: inicialmente determinou-se o *cycle threshold* (CT), dado pelo número do ciclo em que o sinal de fluorescência atingiu a linha limiar (*threshold line*), ou seja, a linha em que a emissão de fluorescência está acima do ruído de fundo (*background*). O CT encontrou-se

invariavelmente na região correspondente à fase exponencial da amplificação, o que torna mais acurada a estimativa de quantificação dos transcritos na amostra original. A normalização dos valores de CT dos genes de interesse foram em relação ao CT do gene constitutivo GAPDH (para o gene IL-10) e ARBP (para os demais genes de interesse), resultando o  $\Delta CT$ , representado pelo  $CT_{(gene)} - CT_{(constitutivo)}$ . Por fim, calculou-se o  $2^{-\Delta CT}$ , sendo este valor a ser trabalhado como representante da expressão relativa para cada gene (Vandesompele *et al.*, 2002). Os *primers* utilizados para amplificação dos genes de interesse estão descritos na tabela a seguir (Tabela 1). Os *primers* utilizados foram previamente padronizados e validados em nosso laboratório (Geraldo *et al.*, 2016). Importante mencionar que todas as etapas da PCR em tempo real foram realizadas segundo o MIQE Guidelines (Bustin *et al.*, 2009).

O *primer* para avaliação dos gene iNOS foi gentilmente cedidos pela profa. Dra. Ana Flávia Popi, da Disciplina de Imunologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP *campus* São Paulo.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores.

Gene	Sequência 5' → 3' (Direto)	Sequência 3' → 5' (Reverso)
<b>ARBP</b>	AGCTGAAGCAAAGGAAGAGTCGGA	ACTTGGTTGCTTTGGCGGGATTAG
<b>GAPDH</b>	AAATGGTGAAGGTCGGTGTG	TGAAGGGGTCGTTGATGG
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<b>IL-6</b>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<b>IL-10</b>	GCTGGACAACATACTGCTAACC	ATTTCCGATAAGGCTTGGCAA
<b>ARG</b>	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	GATGTCCCTAATGACAGCTCCT

### 3.26 Quantificação da produção de citocinas por ELISA

Para quantificar a produção de citocinas no sobrenadante das culturas de macrófagos medulares, as citocinas foram quantificadas por ELISA de captura (R&D systems), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 100  $\mu$ L dos anticorpos de captura foram adicionados na concentração de 4000 ng em cada poço da placa de 96 poços (Costar) e então incubados *overnight* a temperatura ambiente. Após incubação, os poços foram lavados três vezes, com 400  $\mu$ L de tampão de lavagem, e posteriormente bloqueados com 300  $\mu$ L de PBS-BSA 1%, por uma hora a temperatura ambiente. Depois, a placa foi lavada três vezes com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem, em seguida 100  $\mu$ L da amostra ou padrão recombinante foram adicionados. Incubou-se a placa por duas horas a temperatura ambiente. O procedimento de lavagem foi repetido e o anticorpo de detecção foi adicionado, 100  $\mu$ L por poço, diluído em PBS-BSA 1% (400 ng por poço) e as placas incubadas por duas horas a temperatura ambiente. Repetiu-se novamente o procedimento de lavagem e, então, streptavidina diluída 1:200 em PBS (1X) foi adicionada 100  $\mu$ L por poço e a placa incubada por 20 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Após lavagem, foi adicionado 100  $\mu$ L do substrato por poço e esperou-se o tempo de 20 minutos para adição de 50  $\mu$ L por poço da solução de parada ( $\text{NH}_2\text{SO}_4$ , 2N). A leitura foi realizada no leitor de ELISA a 450 nm. Os padrões foram utilizados para confecção de curva padrão a qual foi utilizada para determinar os valores das concentrações das citocinas em cada uma das amostras.

### 3.27 Avaliação da capacidade fagocítica

A capacidade fagocítica dos macrófagos de linhagem J774A.1 e macrófagos medulares (BALB/c e C57BL/6) foi avaliada após tratamento das células com as EVs. Para isso, foram inseridas lamínulas estéreis (13 mm) em placas de 24 poços antes do plaqueamento. Após a colocação das lamínulas,  $2 \times 10^5$  de células foram plaqueadas por poço e incubadas a 37°C a 5% de  $\text{CO}_2$  durante 4 horas. Após, os macrófagos foram tratados com 40-50 partículas de EVs por célula. Depois de 48 h de incubação com EVs de células B-1

infectadas ou não com os parasitas, foram adicionadas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na MOI 5. Após 2 h de infecção, as células foram lavadas para remoção dos protozoários não fagocitados, e posteriormente as culturas foram incubadas por 24 h a 37° C a 5% CO<sub>2</sub>. As células foram coradas com hematoxilina e eosina (*Kit* Panótico Rápido, Laborclin). As lamínulas foram avaliadas sob microscópio óptico para determinação tanto da porcentagem das células infectadas quanto do índice fagocítico (IF). O cálculo do IF foi realizado multiplicando a média do número de parasitas e número de células infectadas por 100. Foram analisados 300 fagócitos por experimento, sendo 100 fagócitos a cada lamínula.

$$IF = \bar{X}(\text{Total de parasitas|célula}) \times \text{número de células infectadas} \times 100$$

### 3.28 Tratamento dos animais com EVs de células B-1

Os animais adquiridos do CEDEME foram mantidos no Biotério Central UNIFESP *campus* Diadema. Após o período de acomodação de 10 dias, os animais foram distribuídos em grupos experimentais para o tratamento: (1) PBS (tratamento com PBS 1X estéril), (2) EV B-1 (tratamento com vesículas extracelulares de células B-1 liberadas após 24 horas) e (3) EV B-1 L.A (tratamento com vesículas extracelulares de células B-1 infectadas durante 24 horas). Depois de 48 horas, os animais foram infectados com o promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Tabela 2).

Para o tratamento, os animais foram submetidos a injeção subcutânea no dorso da pata direita traseira. Foram inoculadas de 10<sup>7</sup> a 10<sup>10</sup> partículas (EVs) diluídas em PBS, tanto de EVs de células B-1 como EVs provenientes de células B-1 infectadas com o parasita ambos em volume final de 20 µL. No grupo PBS (controle negativo) foi injetado 20 µL de PBS (1X). Todo material inoculado nos animais era estéril e o procedimento realizado em fluxo laminar.

Após 48 horas de inoculação das EVs ou PBS, cada camundongo foi infectado com 10<sup>6</sup> promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em volume máximo de 20 µL. A inoculação do parasita foi no tecido subcutâneo no dorso da pata direita traseira (mesma pata que foi

inoculado o tratamento com EVs). Nos grupos de animais não infectados foram administrados com PBS 1X estéril (volume de 20 µL).

Após a infecção, as patas foram medidas semanalmente durante 8 a 9 semanas usando paquímetro. A eutanásia dos animais foi realizada por excesso de anestésico (halotano 3 – 5 %) mantendo até a parada cardiorrespiratória. Após eutanásia, as patas foram assepticamente removidas dos animais para as análises histopatológicas, quantificação da carga parasitária por diluição limitante.

Tabela 2. Distribuição dos grupos e tratamento dos animais.

<b>Grupos</b>	<b>1ª inoculação</b>	<b>2ª inoculação</b>
<b>PBS</b>	PBS	PBS
	PBS	Promastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>
<b>EVs de células B-1</b>	EVs de células B-1	PBS
	EVs de células B-1	Promastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>
<b>EVs de células B-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i></b>	EVs de células B-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i>	PBS
	EVs de células B-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i>	Promastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>
	EVs de células B-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i>	Promastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>

### 3.29 Determinação de carga parasitária por diluição limitante

Após a remoção das patas dos animais, conforme descrito no item 3.28, as patas foram colocadas em placas, individualmente, para pesagem em balança analítica. Depois, foi acrescentado 5 mL de meio 199 completo em cada placa e, em seguida, o tecido foi macerado com auxílio de uma seringa. Posteriormente, amostras de cada animal foram diluídas (1:50) e colocadas em duplicata em placas de cultura (96 poços), e realizada diluição seriada das amostras na razão 2. Todas as placas foram incubadas a 27 °C e após 10 dias os poços foram avaliados microscopicamente para presença da forma promastigota do parasito. A última diluição que apresentou uma célula de parasita foi considerada como a diluição limitante (DL).

Este valor foi então dividido pelo peso do fragmento do órgão utilizado para homogenização inicial.

### **3.30 Análise histopatológica**

Dois camundongos representativos de cada grupo foram utilizados para preparação das lâminas histológicas. Patas inoculadas com *L. (L.) amazonensis*, conforme descrito no item 3.28, foram fixadas em 10% de formaldeído tamponado com PBS 1X (v/v). Após a inclusão em parafina, as amostras foram coradas por hematoxilina e eosina. Secções histológicas foram analisadas e fotografadas em microscópio AxioZeiss Imagem.A2 (Zeiss).

### **3.31 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA). Teste-*t* de student foi utilizado para determinar a significância estatística entre dois grupos. Para os ensaios *in vivo*, foi realizada ANOVA de duas vias, seguida de teste Kruskal-Wallis ou Bonferroni. Valores de  $P < 0.05$  foram considerados significativos.



## RESULTADOS

### 4.1 Caracterização morfológica de EVs liberadas por células B-1 infectadas ou não com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Inicialmente foram realizados experimentos para avaliar a produção de EVs por células B-1 na ausência ou na presença de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Todas as etapas sequenciais para caracterização morfológica e funcional das vesículas liberadas por células B-1 encontram-se sumarizadas na figura que representa o delineamento experimental (Figura 1). Primeiramente, células B-1 peritoneais de camundongos BALB/c foram purificadas e infectadas ou não com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. O período de 24 horas de infecção foi estabelecido por que dados do nosso laboratório mostraram que após 24 horas de infecção *in vitro*, células B-1 apresentaram índice fagocítico significativamente maior que macrófagos peritoneais e medulares submetidos a infecção com os parasitas (Geraldo *et al.*, 2016). O tempo de 48 horas foi adicionado para verificar se essa produção se manteria ao longo do tempo.

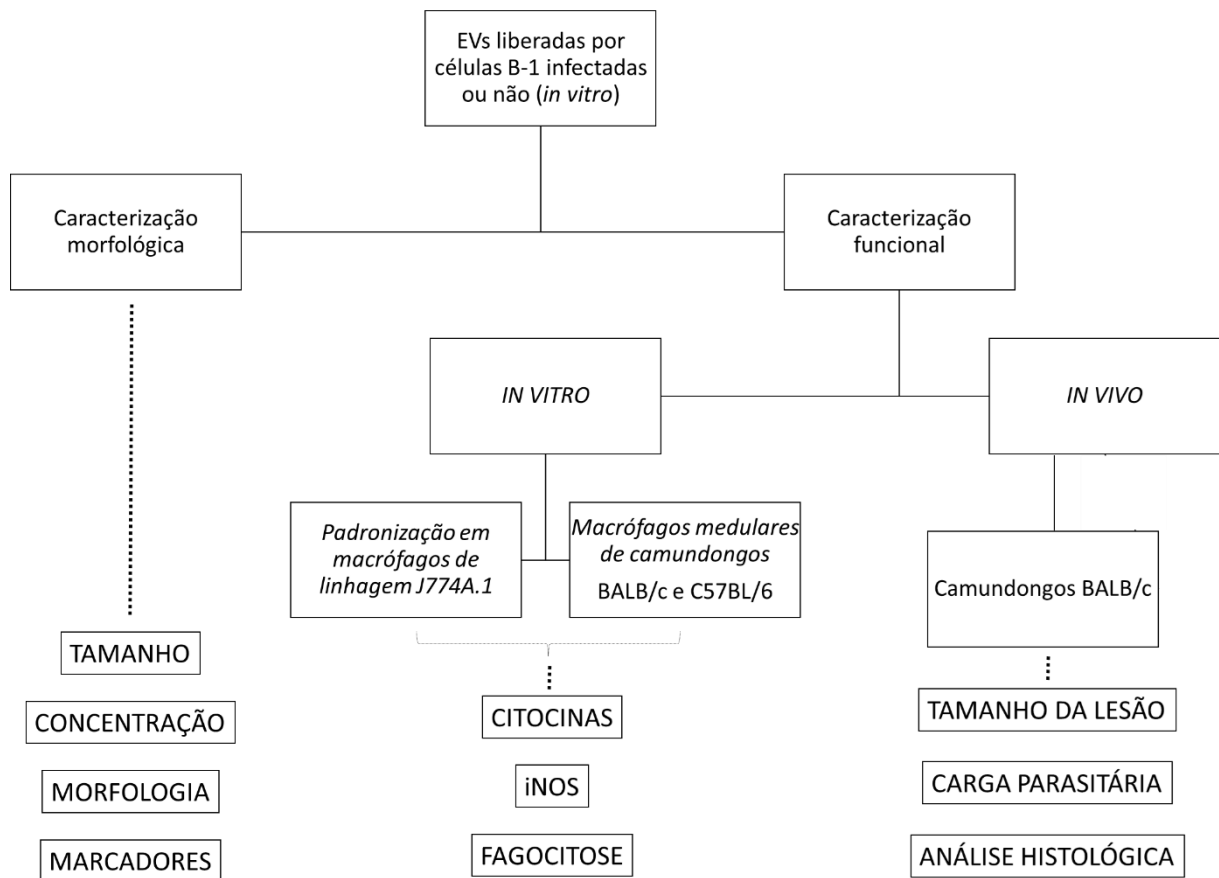
As EVs isoladas foram caracterizadas quanto ao tamanho e concentração no equipamento Nanosight (NTA). Nas análises de tamanho é possível observar que o estímulo de 24 horas levou a perfil de vesículas extracelulares de tamanho entre 70 a 130 nm de diâmetro (uma média de 100 nm de diâmetro de partícula), tanto no controle negativo (ausência de estímulo, somente meio de cultura), como em células B-1 infectadas com o parasita (Figura 2A). Além disso, nota-se que a infecção com o parasita levou a aumento na liberação de vesículas extracelulares por células B-1, especialmente aquelas com tamanho médio de 100 nm (Figura 2A).

Já o estímulo de 48 horas mostrou perfil de tamanho de vesículas bastante homogêneo nas condições testadas (meio e parasita). Neste tempo, a maior parte da população de EVs produzidas apresentou tamanho médio em torno de 100 nm (Figura 2B).

Nota-se que neste período (48 horas) a quantidade de EVs dos grupos (vesículas de células B-1 e vesículas de células B-1 infectadas) aumentou em relação ao período de 24 horas (Figuras 2A e 2B) e manteve-se maior quantidade de vesículas liberadas por células B-1 infectadas (Figura 2B).

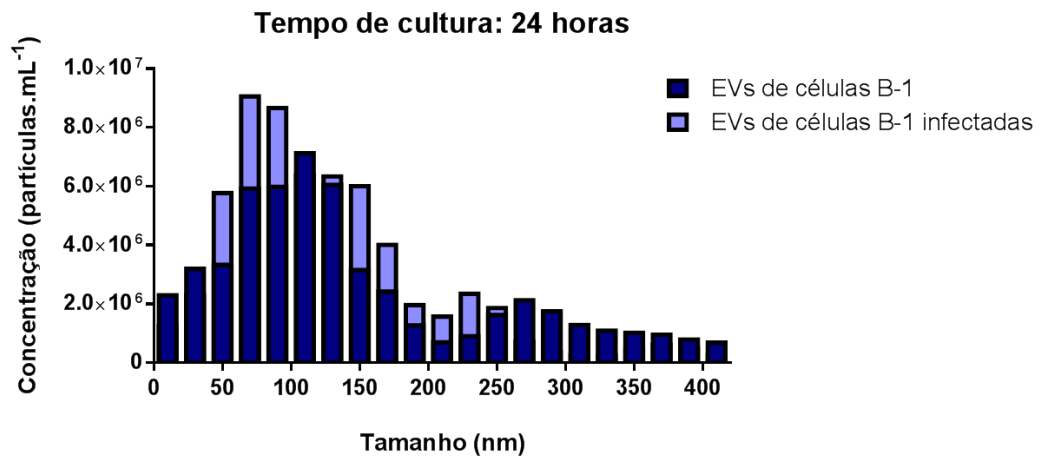
A avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu identificar as estruturas nomeadas de EVs nas células B-1 não infectadas (Figura 3A e 3B) e infectadas (Figura 3C e 3D). Essas imagens confirmaram que existe maior produção das EVs por células B-1 infectadas em comparação às não infectadas. Essas vesículas são observadas tanto na superfície celular como no sobrenadante (aderidas à lamínula) (Figura 3C e 3D), o que mostra um resultado compatível à dosagem por NTA. Além da produção das vesículas, as imagens do MEV também demonstraram que alteração morfológica nas células B-1 infectadas, as quais se tornaram células espreiadas enquanto as não infectadas permaneceram com sua morfologia inicial peritoneal (aparência linfoide).

Além das avaliações por NTA e MEV, foi realizada análise por citometria de fluxo para alguns marcadores de superfície celular. Foi observado que houve redução significativa na expressão da molécula MHC II em EVs provenientes de células B-1 infectadas (1,85% da população presente entre 100 a 500 nm) comparadas as EVs de células B-1 não infectadas (22,7%) (Figura 4C e 4D).

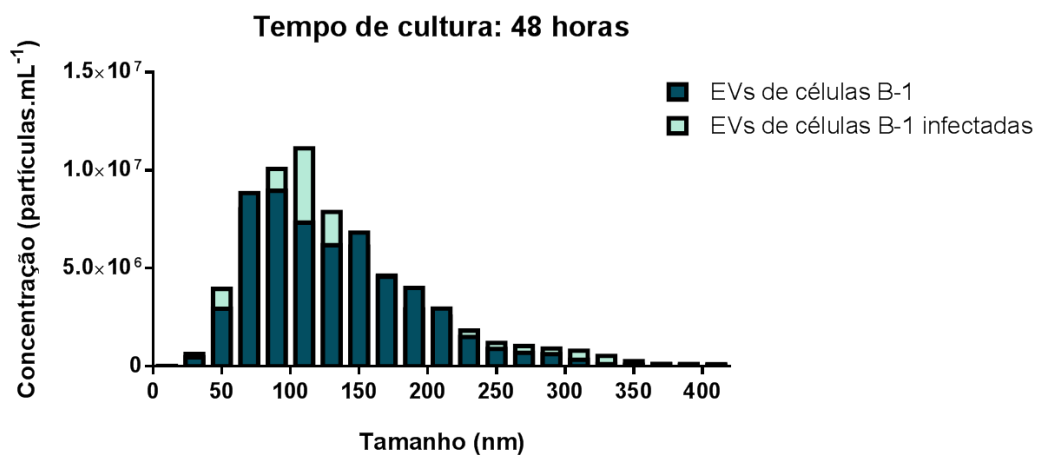


**Figura 1 – Fluxograma da metodologia empregada.** EVs de células B-1 infectadas ou não com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram obtidas após infecção *in vitro* com o parasita nos tempos de 24 e 48 horas. As EVs foram caracterizadas quanto a sua morfologia e função. Na caracterização morfológica, a população de EVs teve seu tamanho e concentração medidos por NTA, aspectos morfológicos visualizados por MEV e identificados marcadores de superfície por citometria de fluxo. Na caracterização funcional, o papel de EVs foi avaliado *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, o papel das EVs foi testado na ativação de macrófagos (de linhagem J774A.1 e medulares de camundongos BALB/c e C57BL/6) por análises de expressão e produção de citocinas, expressão gênica de iNOS e avaliação da capacidade fagocítica. *In vivo*, o papel das EVs foi avaliado no curso da infecção por *L. (L.) amazonensis*. Para tanto, camundongos BALB/c foram previamente tratados com EVs de células B-1 infectadas ou não com o parasita. Após 48 horas, os animais foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Após a infecção dos animais, a progressão da lesão foi acompanhada pela medida semanal das patas (tamanho da lesão) e após a eutanásia dos animais foi determinada a carga parasitária e análise histológica do tecido parasitado.

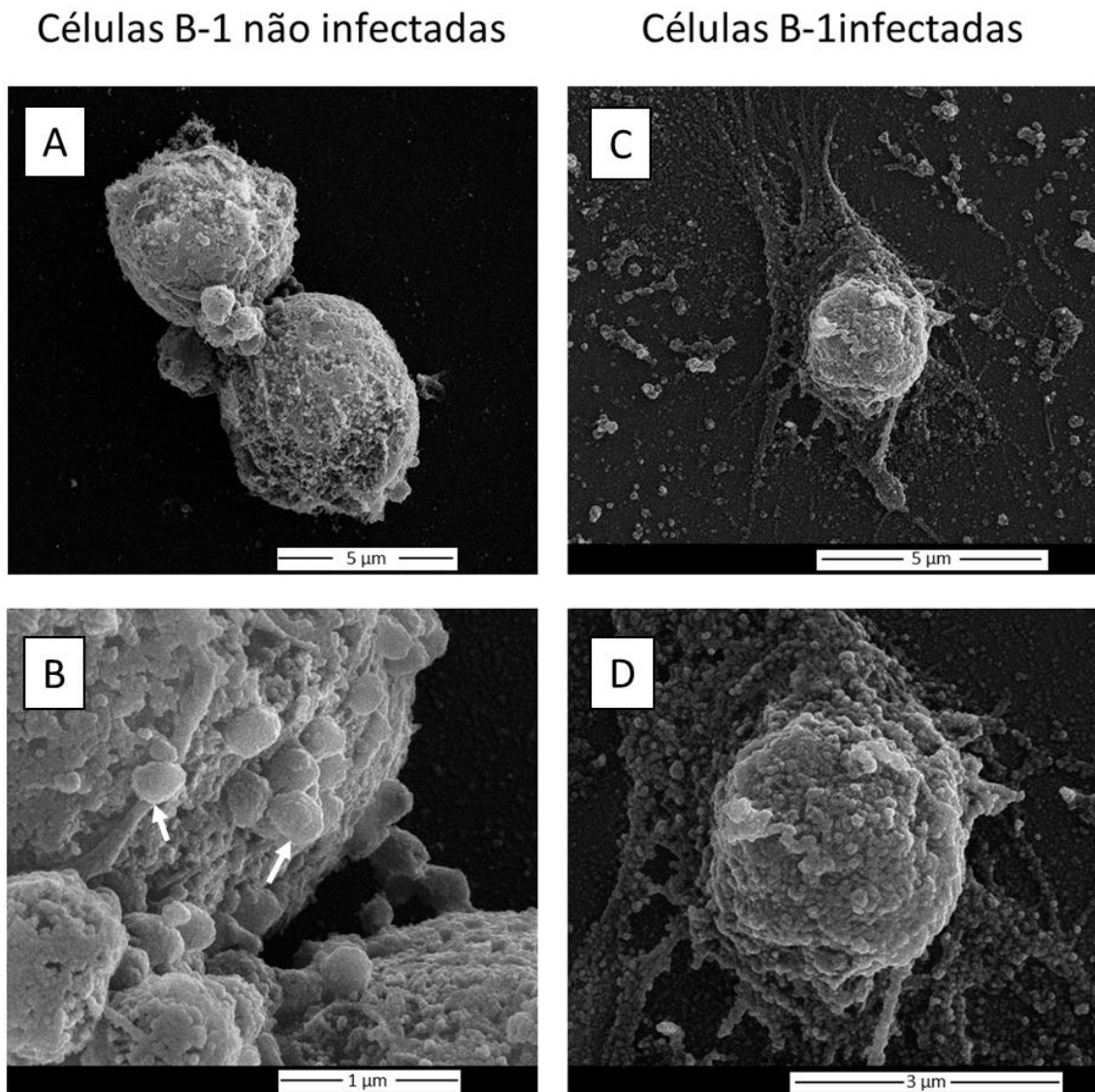
A



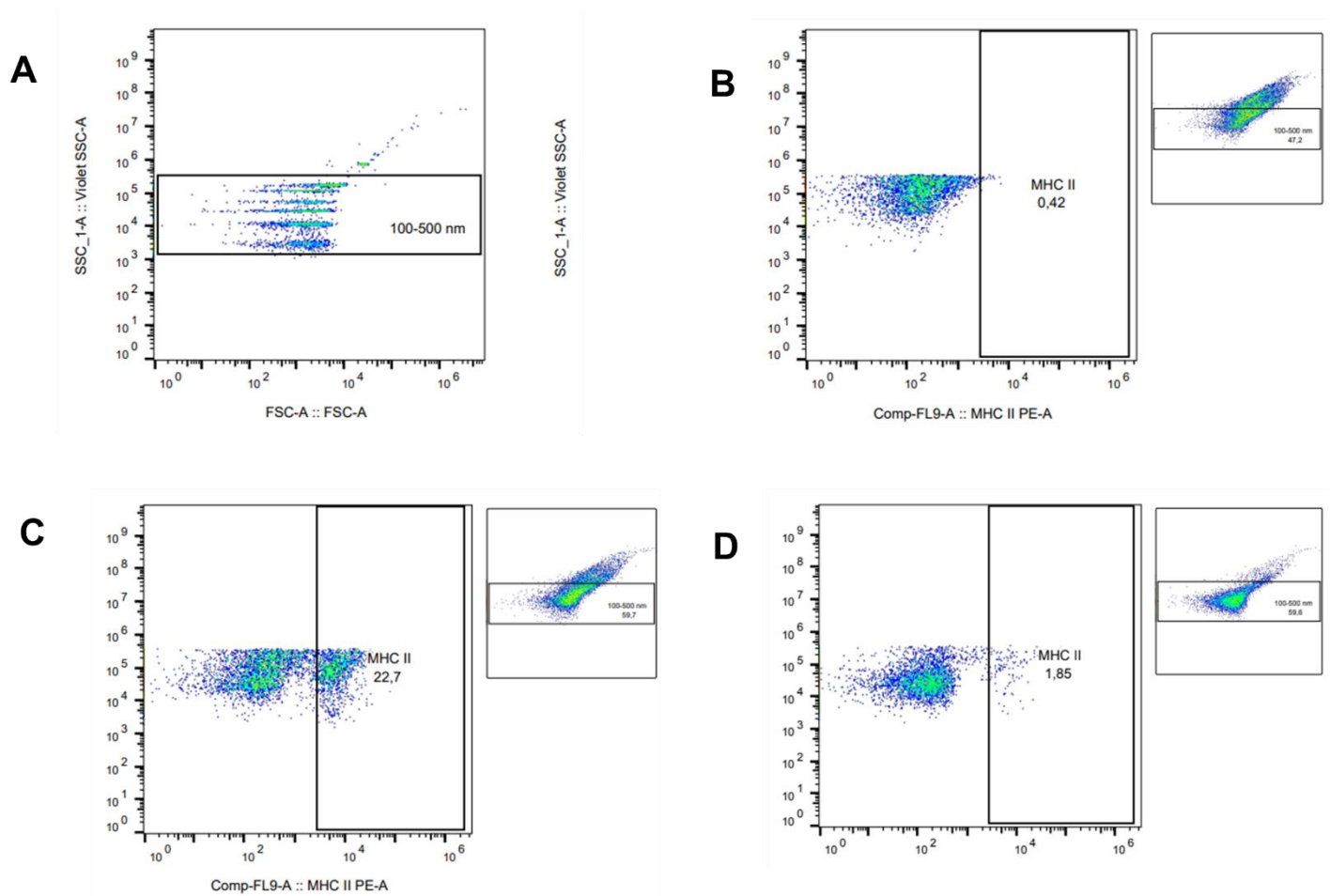
B



**Figura 2 - Caracterização de EVs de células B-1 por NTA.** Células B-1 peritoneais de camundongos BALB/c foram purificadas por colunas magnéticas usando seleção negativa com anti-CD23 seguida por seleção positiva com anti-CD19. Depois da purificação, células B-1 foram mantidas em cultura ou infectadas com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 5) por 24 ou 48 horas. A concentração e o tamanho (diâmetro) das EVs obtidas do sobrenadante de células B-1 infectadas ou não com os parasitas cultivadas por (A) 24 ou (B) 48 horas.



**Figura 3 – Microfotografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando a liberação de EVs por células B-1.** Células B-1 peritoneais de camundongos BALB/c foram purificadas por colunas magnéticas usando seleção negativa com anti-CD23 seguida por seleção positiva com anti-CD19. Depois da purificação, células B-1 foram infectadas ou não com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 5) por 24 horas. (A e B) Células B-1 não infectadas e (C e D) células B-1 infectadas por 24 horas com o parasita. Setas brancas indicam as EVs liberadas pelas células B-1.



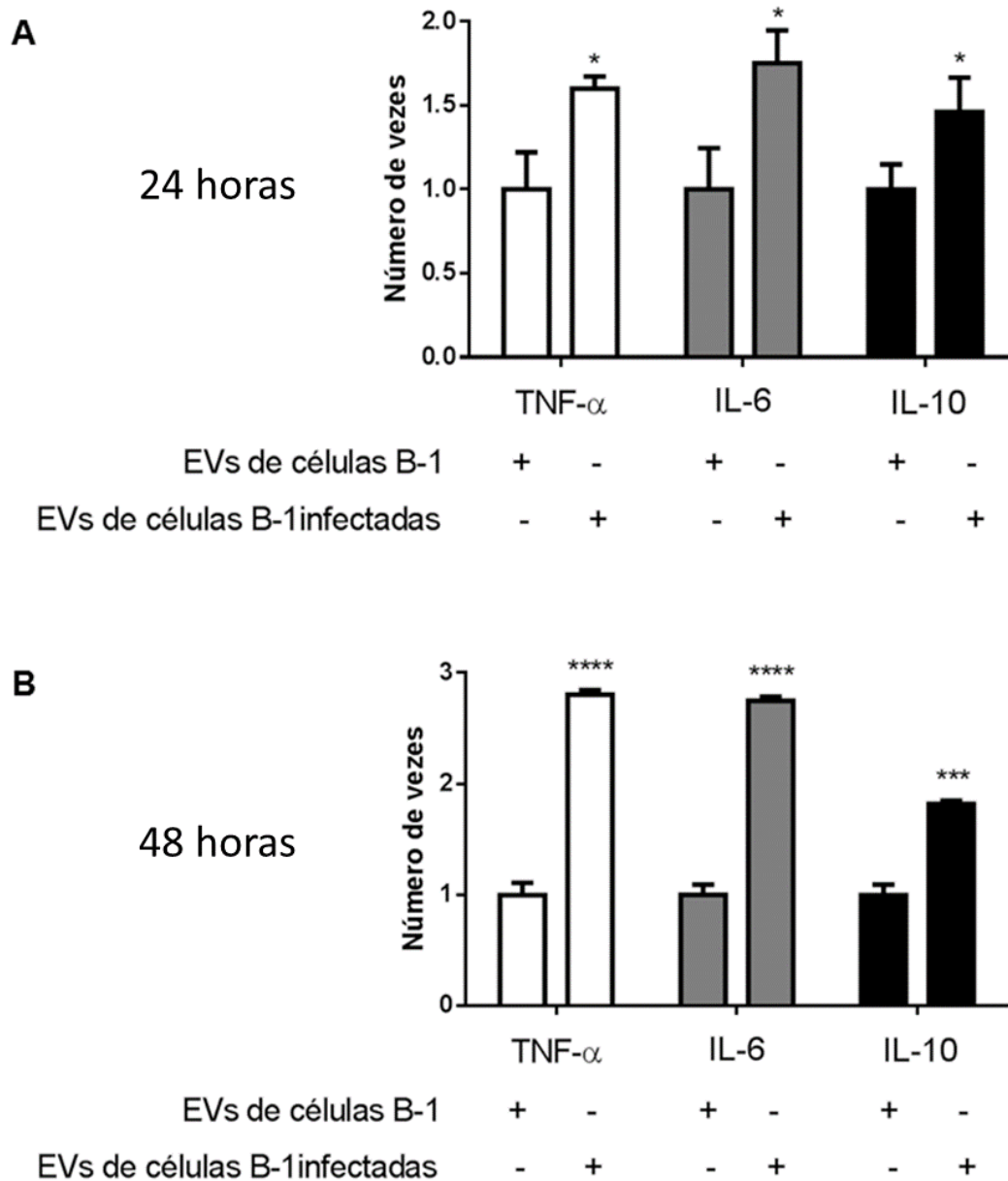
**Figura 4 – Marcação de MHC II em EVs liberadas por células B-1.** (A) Microbeads, (B) EVs de células B-1 sem marcação, (C) EVs de células B-1 marcadas com anticorpo MHC II e (D) EVs de células B-1 infectadas com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* marcadas com anticorpo.

## 4.2 Avaliação do efeito de EVs produzidas por células B-1 em macrófagos da linhagem J774A.1

Após verificar que células B-1 são capazes de liberar vesículas extracelulares foi avaliado o efeito dessas partículas sobre a ativação de macrófagos da linhagem J774A.1. Para esta análise, células B-1 peritoneais de camundongos BALB/c foram obtidas, purificadas e infectadas ou não com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, por 24 ou 48 horas. As EVs obtidas foram usadas para estimular macrófagos da linhagem J774A.1 (background BALB/c) por 48 horas. Depois do tratamento, os seguintes parâmetros foram analisados: perfil de expressão de citocinas anti e pró-inflamatórias, avaliação da capacidade fagocítica e expressão gênica das enzimas ARG e iNOS.

As expressões relativas dos genes TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram determinadas por qRT-PCR. Nos ensaios de amostras submetidas ao estímulo com vesículas extracelulares obtidas a partir de 24 horas de cultura, a análise de expressão gênica dos genes TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 mostrou que houve aumento significativo destas citocinas em macrófagos J774A.1 estimuladas com vesículas provenientes de células B-1 infectadas, em comparação os macrófagos estimulados com vesículas de células B-1 não infectadas ( $P=0,0111$ ;  $P=0,0142$  e  $P=0,0346$ , respectivamente) (Figura 5A).

Nos macrófagos J774A.1 tratados com EVs provenientes de culturas de 48 horas, notou-se aumento mais pronunciado e significativo na expressão das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em células que foram tratadas com EVs de células B-1 infectadas quando comparadas as EVs provenientes das culturas de células B-1 não infectadas ( $P \leq 0,0001$ ) (Figura 5B). Assim, EVs de células B-1 infectadas por 24 ou 48 horas promoveram aumento na produção de citocinas anti-inflamatória (IL-10) e pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) em macrófagos J774A.1, sugerindo que possivelmente essas partículas contribuem no curso da infecção, alterando o estado de ativação dos macrófagos.

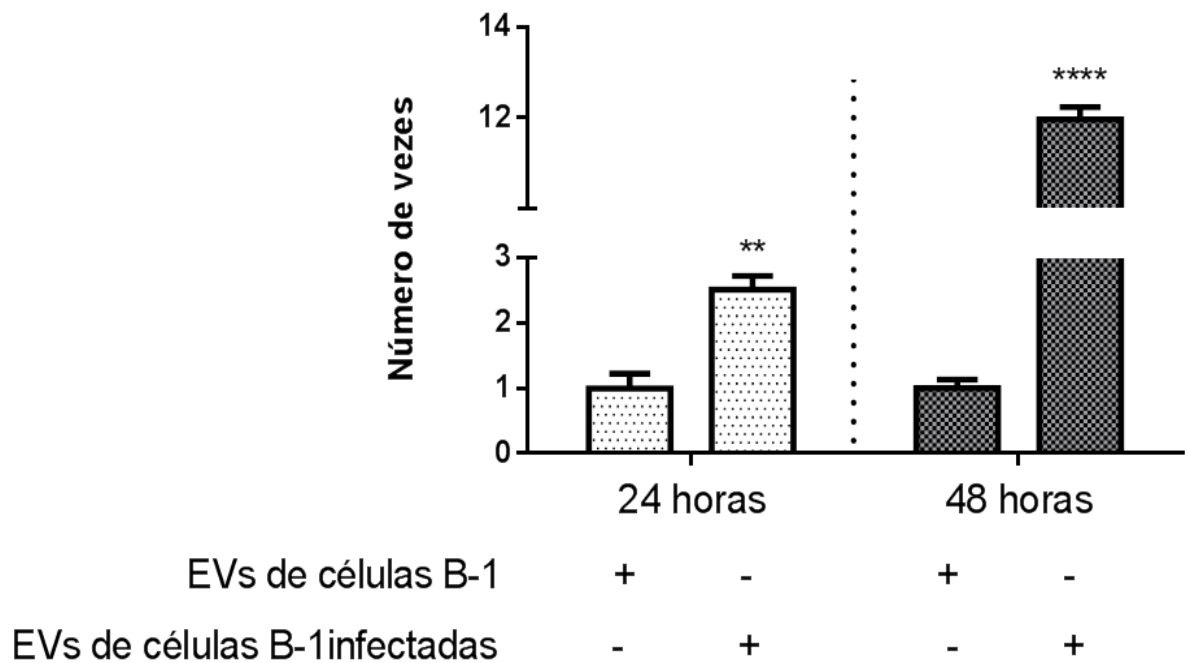


**Figura 5 - Expressão gênica de citocinas em células J774A.1.** Expressão gênica dos transcritos TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em células da linhagem J774A.1 após 48 horas de tratamento com EVs de células B-1. Células B-1 foram purificadas das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c e infectadas *in vitro* com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 5) por 24 ou 48 horas para a obtenção de EVs. Posteriormente, macrófagos da linhagem J774A.1 foram estimulados durante 48 h com EVs provenientes de células B-1 mantidas em cultura por (A) 24 e (B) 48 horas. As barras representam a média das triplicatas e as barras de erro o desvio padrão. Teste t-student controle B-1 versus B-1 infectada, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P = 0,0001$  e \*\*\*\*  $P < 0,0001$ . Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes.

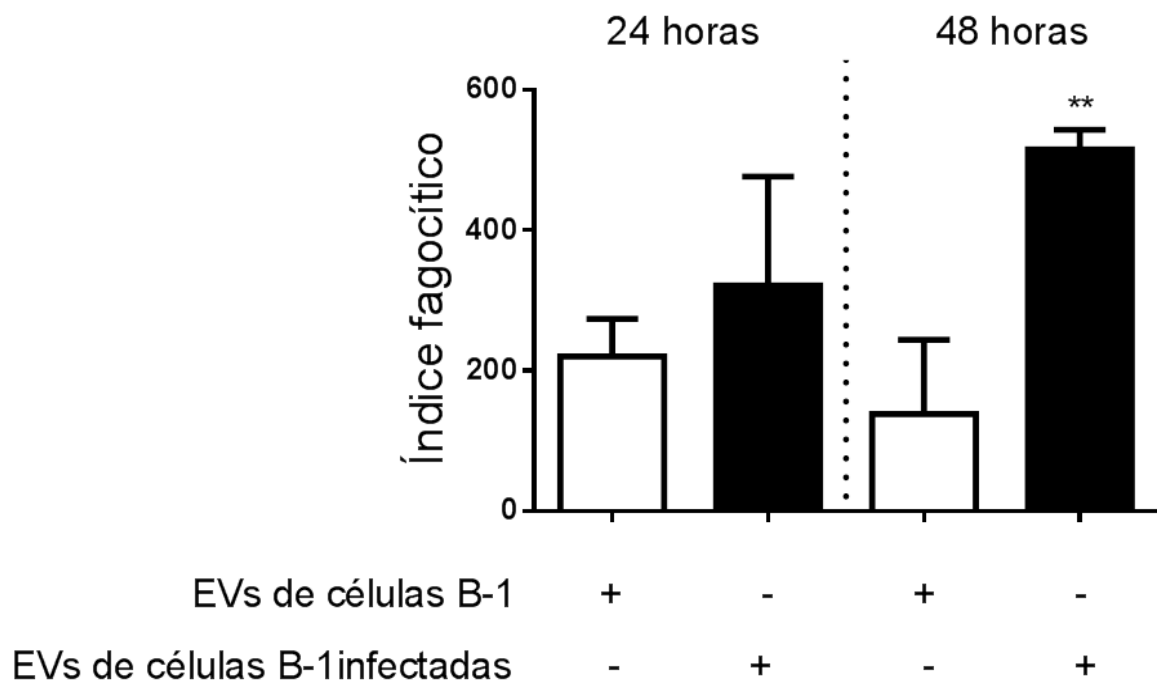


Além das citocinas, o perfil de expressão das enzimas ARG e iNOS também foi avaliado por qRT-PCR. Nos ensaios, os macrófagos de linhagem J774A.1 submetidos ao tratamento com EVs provenientes de células B-1 infectadas (tanto aquelas obtidas do sobrenadante das culturas mantidas por 24 horas quanto aquelas das culturas de 48 horas) apresentaram aumento significativo de iNOS em relação ao seu controle (tratamento com EV de células B-1 não infectadas). No entanto, o aumento foi mais pronunciado, quando os macrófagos J774A.1 foram tratados com EVs de células B-1 infectadas por 48 horas (Figura 6). O gene ARG não amplificou em nenhuma das condições testadas (dados não mostrados).

A capacidade fagocítica dos macrófagos J774A.1 após tratamento com EVs de células B-1 também foi avaliada. Os macrófagos foram tratados por 48 horas com EVs de células B-1. Após estímulo, as células foram infectadas com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 5). Os resultados apresentados demonstraram que EVs provenientes de células B-1 de camundongos BALB/c co-cultivadas por 48 horas com o parasita levaram a aumento significativo no índice fagocítico dos macrófagos J774A.1, em comparação ao controle (EVs de células B-1 não infectadas) ( $P = 0,0040$ ). Já as EVs produzidas em 24 horas, não induziram mudança significativa no índice fagocítico dos macrófagos tratados (Figura 7).



**Figura 6. Expressão gênica de iNOS em células J774A.1.** Expressão relativa de mRNA da enzima iNOS em macrófagos de linhagem J774A.1 após 48 h de tratamento com EVs de células B-1. Células B-1 foram purificadas das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c e *in vitro* infectadas com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 5) por 24 ou 48 horas. Posteriormente, macrófagos da linhagem J774A.1 foram estimulados durante 48 h com EVs de 24 (esquerda) ou 48 horas (direita) provenientes de células B-1 infectadas ou não. Depois do estímulo, o RNA foi extraído e a expressão de iNOS foi determinada por qRT-PCR. Barras representam a triplicata, e erros das barras denotam o desvio padrão. Dados são representativos de três experimentos independentes. Análise estatística com teste T-student (\*\*P = 0,0011; \*\*\*\*P<0,0001).



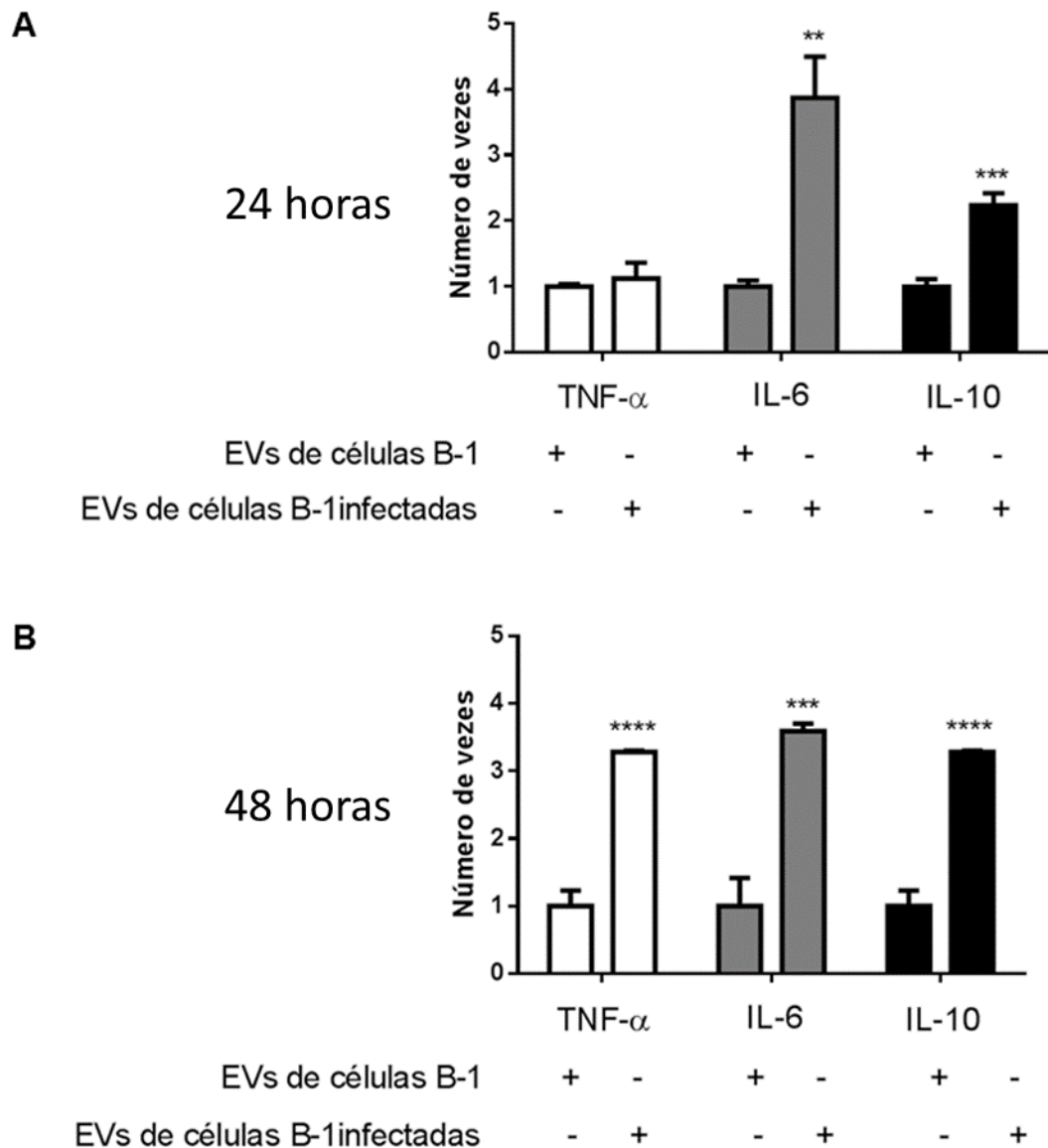
**Figura 7 - Índice fagocítico em células J774A.1.** Índice fagocítico de macrófagos da linhagem J774A.1 tratados com EVs de células B-1. Células B-1 foram purificadas das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c e infectadas *in vitro* por 24 ou 48 h com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Posteriormente, macrófagos da linhagem J774A.1 foram estimulados durante 48 h com EVs de 24 (esquerda) ou 48 horas (direita) provenientes de células B-1 infectadas ou não com o parasita. Após o tratamento, macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por 24 h (MOI 5). As células foram coradas com hematoxilina-eosina e o índice fagocítico foi calculado. Barras representam a média da triplicata, e os erros das barras denotam o desvio padrão. Dados são representativos de três experimentos independentes. Análise estatística com teste T-student (\*\* $P = 0,0040$ , comparado ao respectivo controle)

### **4.3 Efeito de EVs de células B-1 em macrófagos medulares provenientes de camundongos da linhagem BALB/c e C57BL/6**

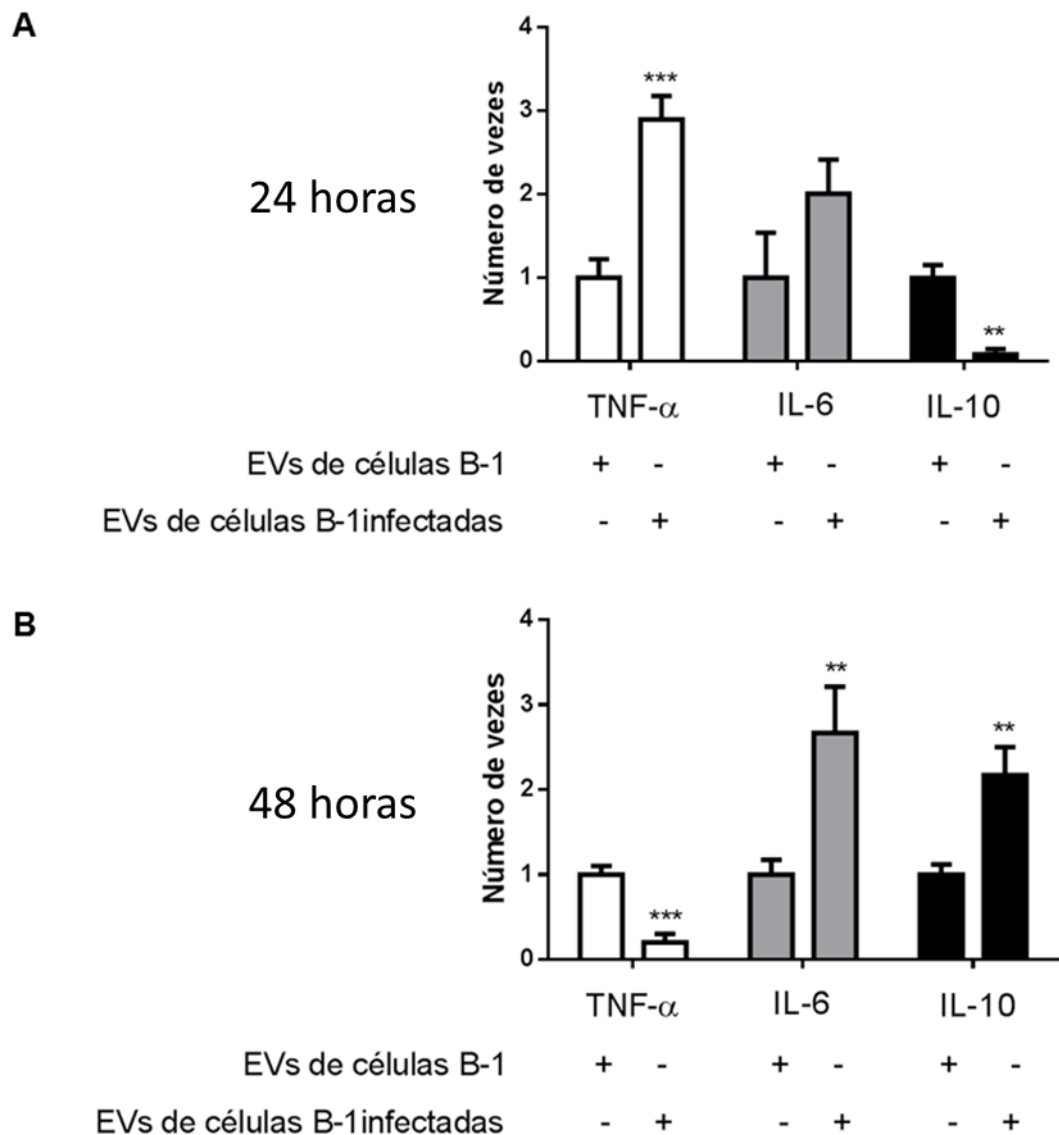
Macrófagos provenientes da medula óssea (macrófagos medulares) de camundongos BALB/c e C57BL/6 foram estimulados com EVs de células B-1 das respectivas linhagens e avaliados com os seguintes parâmetros: produção de citocinas anti e pró-inflamatórias, capacidade fagocítica e avaliação da expressão gênica das enzimas ARG e iNOS. A avaliação e procedimentos empregados foram realizados conforme descrito para macrófagos J774A.1.

O perfil de expressão de macrófagos medulares de animais BALB/c estimulados por EVs de 24 horas mostrou aumento significativo nos genes IL-6 e IL-10 ( $P = 0,0014$ ;  $P = 0,0006$ , respectivamente), mas não de TNF- $\alpha$ , em relação ao estímulo de EVs de células B-1 não infectadas (Figura 8A). Quando macrófagos medulares foram tratados com EVs de 48 horas, houve aumento significativo na expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 ( $P < 0,0001$ ;  $P = 0,0005$  e  $P < 0,0001$ , respectivamente), em comparação ao grupo controle (EVs de células B-1 não infectadas) (Figura 8B).

Macrófagos medulares de animais C57BL/6 estimulados por EVs de células B-1 cultivadas por 24 horas apresentaram aumento significativo no gene TNF- $\alpha$  ( $P = 0,0008$ ) e diminuição de IL-10 ( $P = 0,0044$ ), em relação aos macrófagos tratados com EVs de células não infectadas (Figura 9A). Não houve diferença na expressão de IL-6 (Figura 8A). Já os macrófagos tratados por EVs de células B-1 infectadas com o parasita por 48 horas apresentaram redução significativa de TNF- $\alpha$  ( $P = 0,0006$ ) e aumento tanto na expressão de IL-6 ( $P = 0,0072$ ) como do gene IL-10 ( $P = 0,0044$ ) comparando com seus respectivos controles (Figura 9B).



**Figura 8 – Expressão gênica de citocinas em macrófagos provenientes de camundongos BALB/c.** Expressão relativa de mRNA das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em macrófagos medulares de camundongos BALB/c após 48 h de tratamento com EVs de células B-1. Células B-1 foram purificadas das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c e infectadas *in vitro* com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 5) por 24 ou 48 horas. Posteriormente, macrófagos medulares foram estimulados durante 48 h com EVs de células B-1 infectadas ou não com o parasita. Após estímulo, o RNA foi extraído e a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foi determinada por qRT-PCR. (A) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 mantidas por 24 horas na presença ou ausência do parasita. (B) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 mantidas por 48 horas na presença ou ausência do parasita. Barras representam a triplicata, e erros das barras denotam o desvio padrão. Dados são representativos de três experimentos independentes. Análise estatística com teste *T-student* (\*\* $P = 0,0005$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$ ).

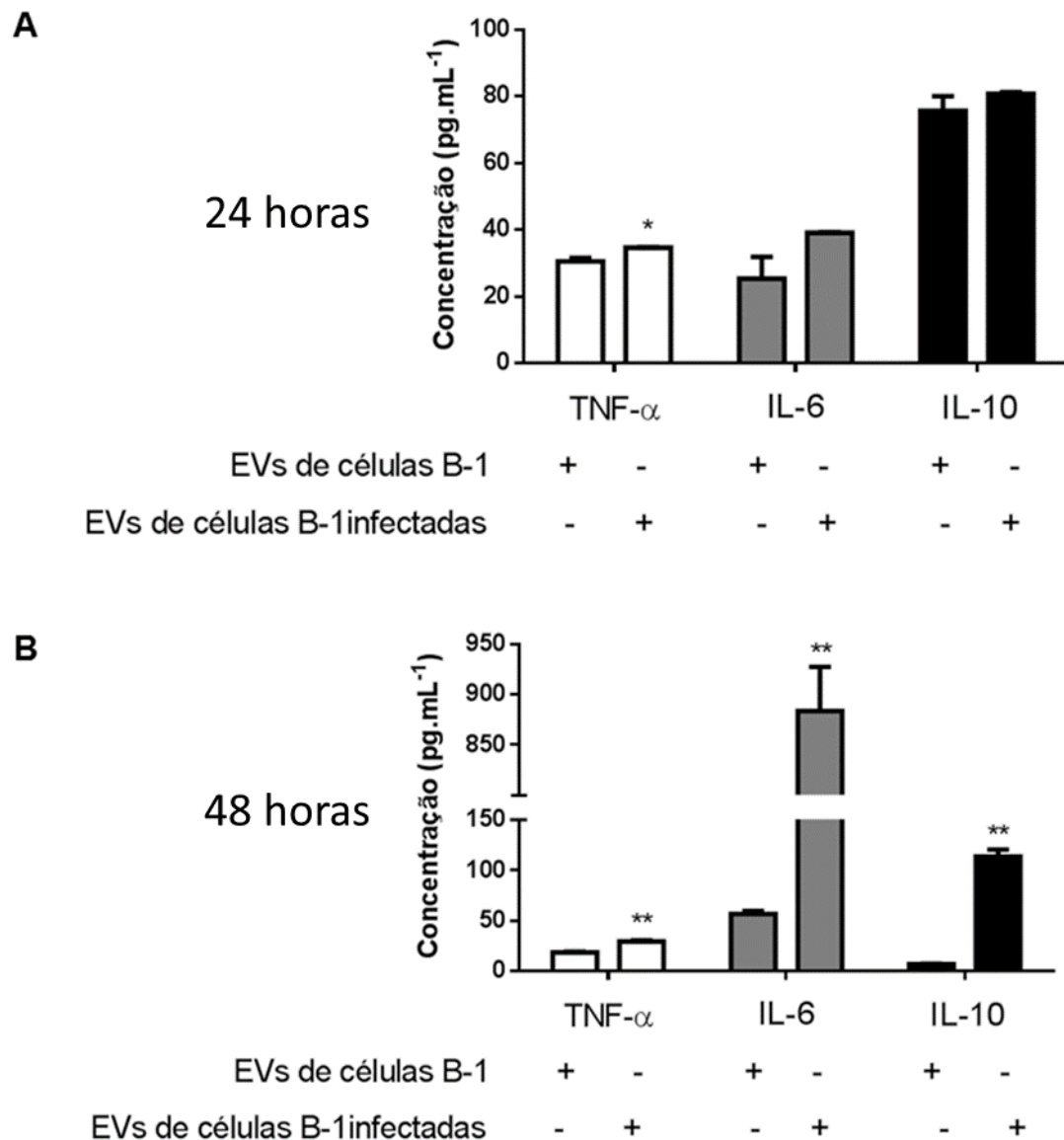


**Figura 9 – Expressão gênica de citocinas em macrófagos de camundongos C57BL/6.**

Expressão relativa de mRNA das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em macrófagos medulares de camundongos C57BL/6 após 48 h de tratamento com EVs de células B-1. Células B-1 foram purificadas das cavidades peritoneais de camundongos C57BL/6 e infectadas *in vitro* com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 5) por 24 ou 48 horas. Posteriormente, macrófagos medulares foram estimulados durante 48 h com EVs de células B-1 infectadas ou não com o parasita. Após estímulo, o RNA foi extraído e a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foi determinada por qRT-PCR. (A) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 mantidas por 24 horas na presença ou ausência do parasita. (B) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 mantidas por 48 horas na presença ou ausência do parasita. Barras representam a triplicata, e erros das barras denotam o desvio padrão. Dados são representativos de três experimentos independentes. Análise estatística com teste *T-student* (\*\*\* $P = 0,0005$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$ ).

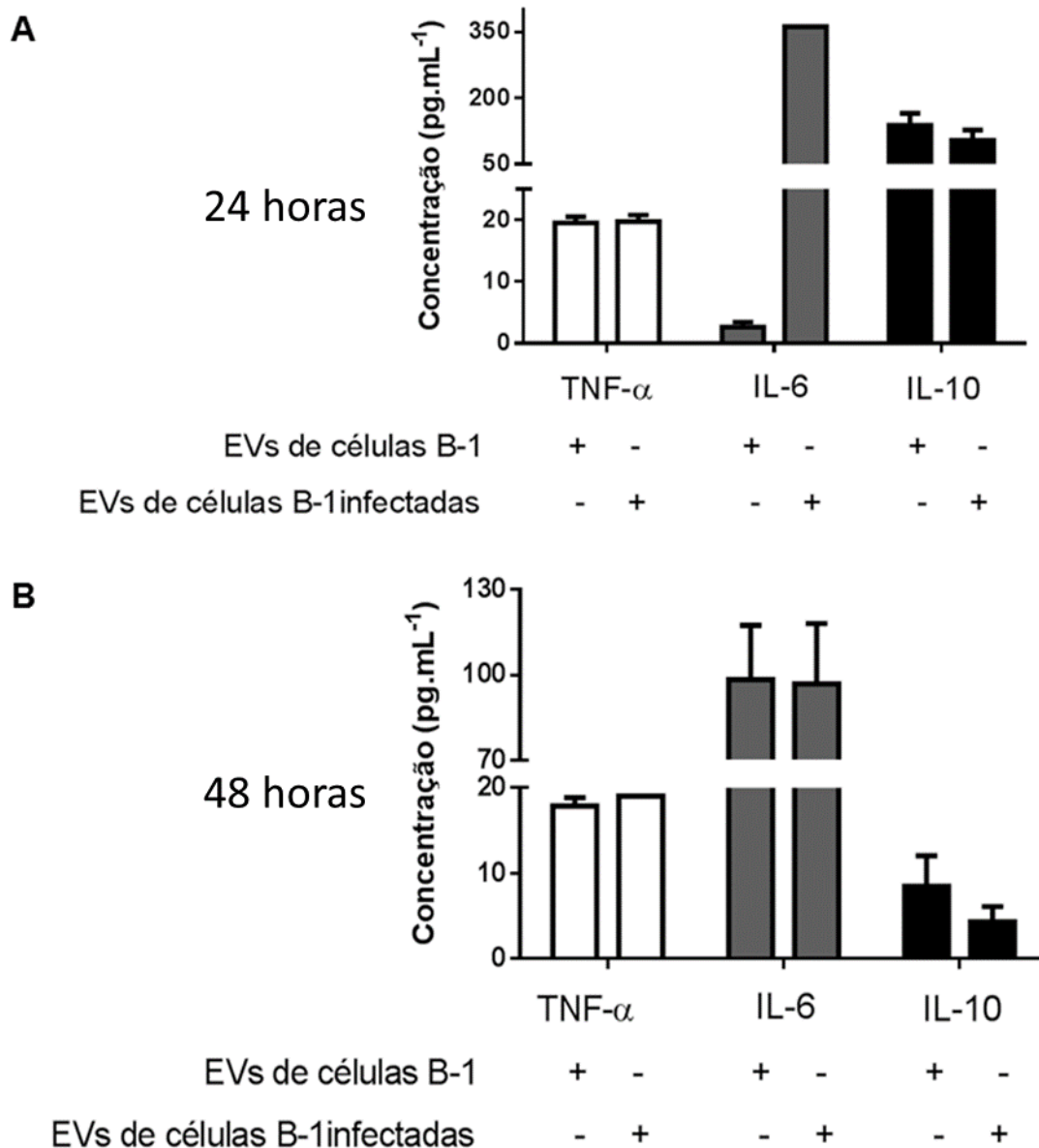
Estudos preliminares foram realizados para avaliar expressão das citocinas usando o método de ELISA. Neste procedimento, o sobrenadante das culturas foi utilizado. Macrófagos medulares de camundongos BALB/c que foram tratados por EVs de células B-1 infectadas por 24 horas apresentaram aumento significativo na citocina TNF- $\alpha$  quando comparado ao controle (EVs de células B-1 não infectadas) ( $P = 0,0303$ ). Não houve diferença significativa para as citocinas IL-6 e IL-10 (Figura 10A). Já macrófagos medulares que foram tratados por EVs de células B-1 infectadas durante 48 horas apresentaram aumento significativo na produção das três citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 ( $P = 0,0068$ ;  $P = 0,0014$  e  $P = 0,0022$ , respectivamente) quando comparado ao controle (EVs de células B-1 não infectadas) (Figura 10B).

Quando macrófagos medulares de camundongos C57BL/6 foram estimulados por EVs de células B-1 cultivadas por 24 horas, houve aumento significativo de IL-6 (Figura 11A). Não houve diferença em nenhuma das citocinas avaliadas quando foram utilizadas EVs provenientes de cultura de células B-1 cultivadas por 48 horas na presença ou ausência dos parasitas (Figura 11B).



**Figura 10 - Quantificação por ELISA de citocinas produzidas por macrófagos de camundongos BALB/c.** Avaliação por ELISA das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em macrófagos medulares de camundongos BALB/c após 48 h de tratamento com EVs de células B-1. Células B-1 foram purificadas das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c e infectadas *in vitro* com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 5) por 24 ou 48 horas. Posteriormente, os macrófagos medulares foram estimulados durante 48 h com EVs de células B-1 infectadas ou não com o parasita. Depois do estímulo, o sobrenadante foi coletado para detecção de citocinas por ELISA-kit. (A) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 mantidas por 24 horas na presença ou ausência do parasita. (B) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 mantidas por 48 horas na presença ou ausência do parasita. Barras representam a triplicata, e erros das barras denotam o desvio padrão. Dados são representativos de três experimentos independentes.



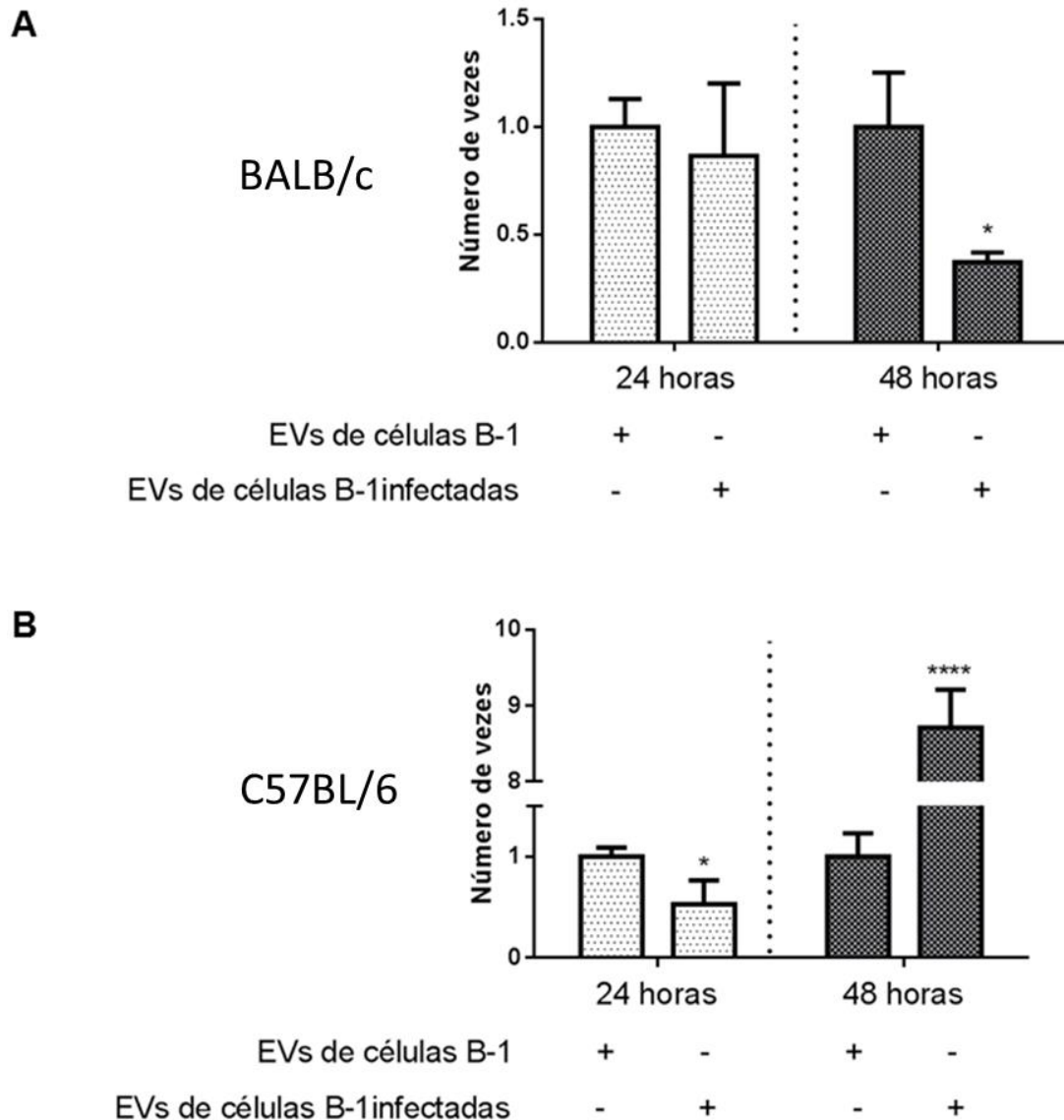


**Figura 11 – Quantificação por ELISA de citocinas produzidas por macrófagos de camundongos C57BL/6.** Avaliação por ELISA das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em macrófagos medulares de camundongos C57BL/6 após 48 h de tratamento com EVs de células B-1. Células B-1 foram purificadas das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c e infectadas *in vitro* com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 5) por 24 ou 48 horas. Posteriormente, os macrófagos medulares foram estimulados durante 48 h com EVs de células B-1 infectadas ou não com o parasita. Depois do estímulo, o sobrenadante foi coletado para detecção de citocinas por ELISA-kit. (A) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 mantidas por 24 horas na presença ou ausência do parasita. (B) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 mantidas por 48 horas na presença ou ausência do parasita. Barras representam a triplicata, e erros das barras denotam o desvio padrão. Dados são representativos de três experimentos independentes

A avaliação da expressão dos genes ARG e iNOS foi realizada por qRT-PCR. Para macrófagos medulares provenientes de camundongos BALB/c, não houve alteração na expressão de iNOS em macrófagos estimulados com EVs de células B-1 cultivadas por 24 horas na presença ou ausência dos parasitas (Figura 12A). Contudo, observou-se diminuição significativa de iNOS nos macrófagos tratados com EVs de células B-1 infectadas por 48 horas, quando comparado ao controle (EVs de células B-1 não infectadas) ( $P = 0,0134$ ) (Figura 12A).

Para macrófagos medulares provenientes de camundongos C57BL/6, a expressão de iNOS, reduziu significativamente após o tratamento com EVs de células B-1 infectadas por 24 horas ( $P = 0,0318$ ) (Figura 12B). Por outro lado, macrófagos tratados com EVs de células B-1 infectadas durante 48 horas com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* apresentaram aumento na expressão de iNOS ( $P < 0,0001$ ), quando comparados ao respectivo controle (macrófagos tratados com EVs de células B-1 não infectadas) (Figura 12B).

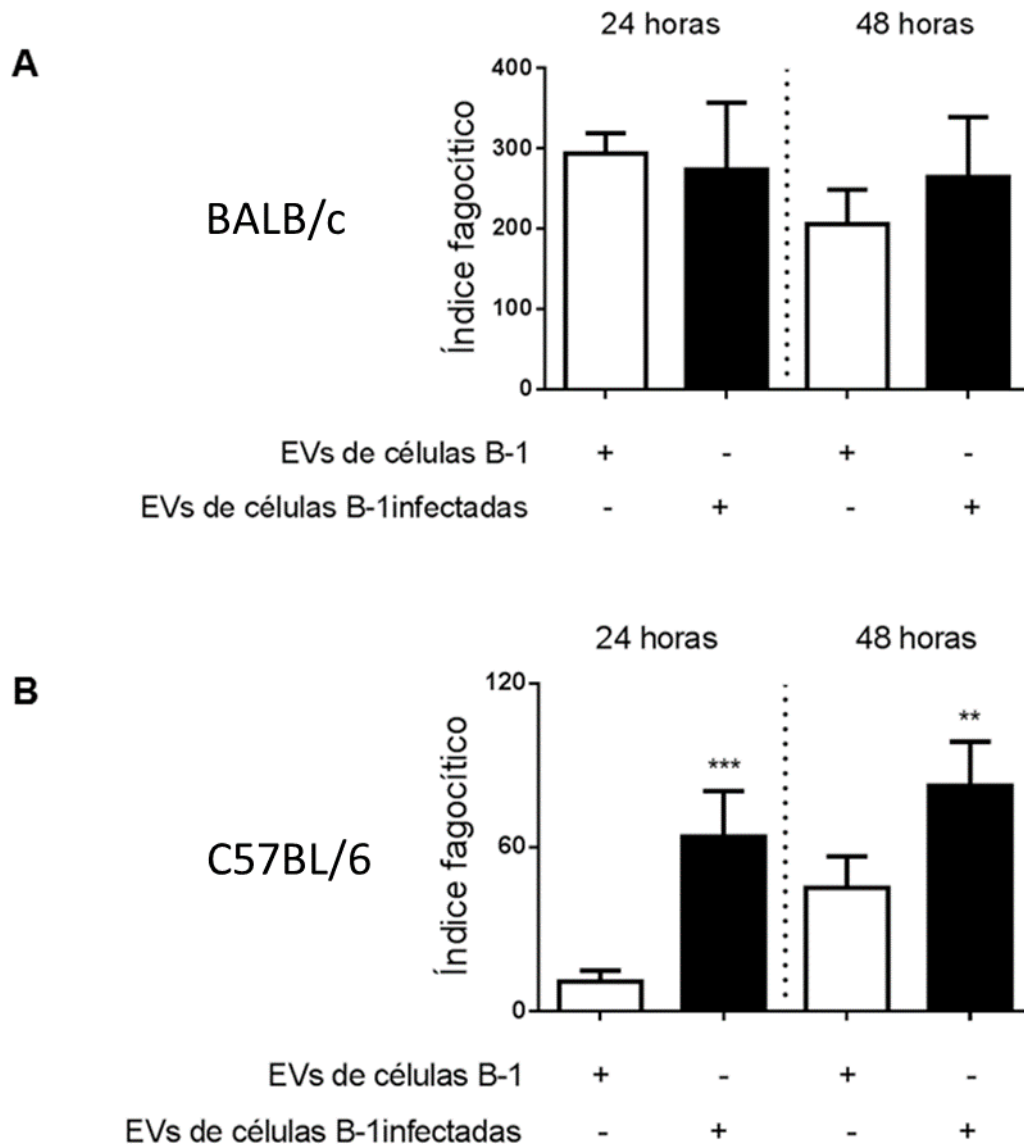
A expressão do gene ARG não foi detectada em nenhuma das condições testadas e em nenhuma das linhagens de macrófagos utilizadas (dados não apresentados).



**Figura 12 – Expressão gênica de iNOS em macrófagos provenientes de camundongos BALB/c e C57BL/6.** Expressão relativa de mRNA da enzima iNOS em macrófagos medulares de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 48 h de tratamento com EVs de células B-1. Células B-1 foram purificadas das cavidades peritoneais e infectadas *in vitro* por 24 ou 48 h com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Posteriormente, macrófagos medulares foram estimulados durante 48 h com EVs de células B-1 infectadas ou não com o parasita. Depois do estímulo, RNA foi extraído e a expressão de iNOS foi determinada por qRT-PCR. (A) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 de camundongos BALB/c. (B) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 de camundongos C57BL/6. Barras representam a triplicata, e erros das barras denotam o desvio padrão. Dados são representativos de três experimentos independentes. Análise estatística com teste T-student (\*P = 0,0318 e \*\*\*\*P<0,0001), comparado com respectivo controle.

A capacidade fagocítica de macrófagos medulares tratados com EVs de células B-1 foi também avaliada. A Figura 13 mostra que macrófagos de camundongos BALB/c não apresentaram diferenças significativas no índice fagocítico após tratamento com EVs de células B-1, tanto aquelas EVs obtidas de culturas de 24 horas quanto às coletadas após 48 horas de cultura (Figura 13A).

Macrófagos medulares provenientes de camundongos C57BL/6 apresentaram maior índice fagocítico tanto na presença de EVs de células B-1 infectadas por 24 horas quanto naquelas obtidas após 48 horas de infecção, em comparação aos respectivos grupos controle (macrófagos tratados com EVs de células B-1 não infectadas) ( $P = 0,0009$  e  $P = 0,0094$ , respectivamente) (Figura 13B).



**Figura 13 – Capacidade fagocítica de macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6.**

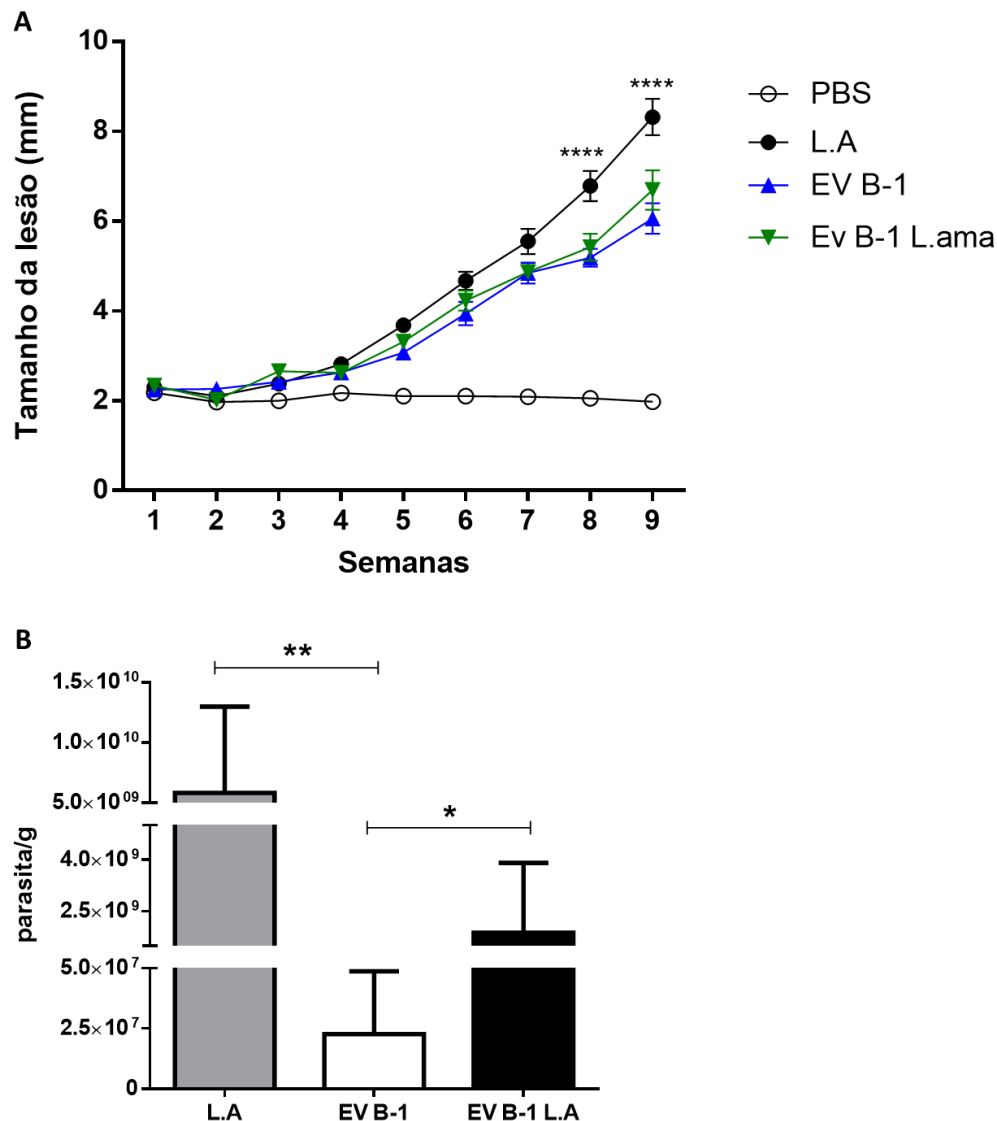
Índice fagocítico de macrófagos medulares provenientes de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com EVs de células B-1. Células B-1 foram purificadas das cavidades peritoneais e infectadas *in vitro* por 24 ou 48 h com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Posteriormente, macrófagos medulares foram estimulados durante 48 h com EVs de células B-1 infectadas ou não com o parasita. Após tratamento, macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por 24 h (MOI 5). As células foram coradas com hematoxilina-eosina e o índice fagocítico foi calculado, conforme descrito em material e métodos. (A) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 de camundongos BALB/c. (B) Tratamento de macrófagos com EVs provenientes de culturas de células B-1 de camundongos C57BL/6. Barras representam a média da triplicata, e os erros das barras denotam o desvio padrão. Dados são representativos de três experimentos independentes. Análise estatística, teste T-student.

#### **4.4 Papel das EVs de células B-1 na progressão da infecção experimental em camundongos BALB/c**

Os dados obtidos na avaliação *in vitro* do efeito de EVs de células B-1 na modulação de macrófagos levaram a outros questionamentos, em especial se essas EVs poderiam influenciar o curso da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Para essa análise, animais foram pré-tratados subcutaneamente com EVs provenientes de células B-1 infectadas ou não com os parasitas. Animais controles foram inoculados com PBS. Após dois dias, os camundongos foram desafiados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e a progressão da lesão avaliada semanalmente. Foi observada redução significativa no tamanho da lesão a partir da 8ª semana, nos grupos dos animais tratados com EVs de células B-1 em comparação ao grupo controle (camundongos tratados com PBS e posteriormente infectados) (Figura 14A).

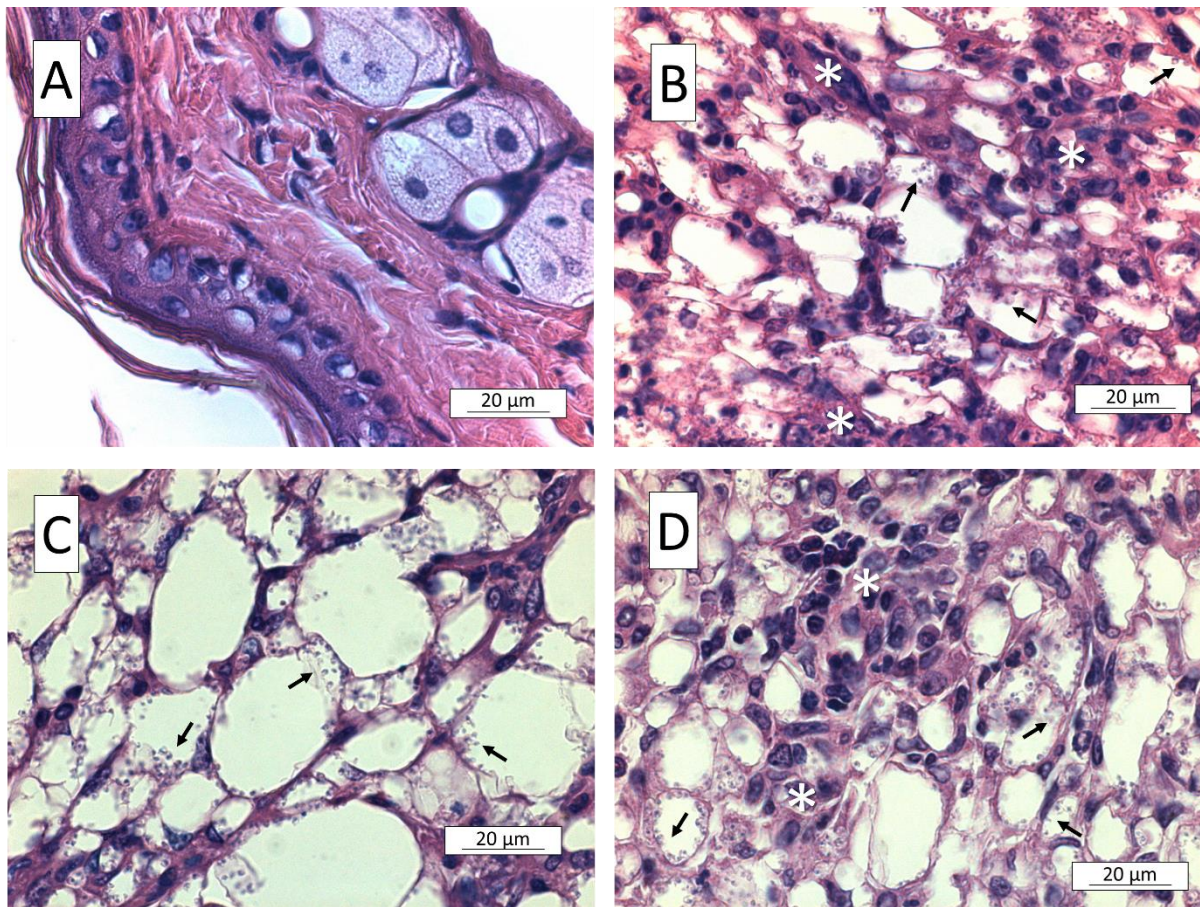
Após 9 semanas, os animais foram eutanasiados e a carga parasitária das patas foi avaliada por diluição limitante. Na análise da carga parasitária, o grupo tratado com vesículas provenientes de células B-1 não infectadas (EV B-1) apresentou redução significativa no número de parasitas/g em comparação ao grupo controle (L.A) (\*\*P  $\leq$  0,001) e ao grupo dos animais tratados com EVs provenientes de células B-1 infectadas (EV B-1 L.A) (\*P < 0,05) (Figura 14B).

Diferenças no processo inflamatório e na carga parasitária foram também observadas nas análises histológicas do tecido, mostrando que animais tratados com EVs de células B-1 não infectadas apresentam maior preservação tecidual, além de possuir menor carga parasitária e infiltrado celular (Figura 15). Animais tratados com EVs provenientes de células B-1 infectadas apresentaram padrão intermediário de carga parasitária e infiltrado inflamatório.



**Figura 14 – Avaliação da progressão da lesão e da carga parasitária em animais tratados com Evs provenientes de células B-1.** (A) Desenvolvimento das lesões na pata de camundongos BALB/c tratados com EVs de células B-1 infectadas ou não e posteriormente infectados com  $1 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. O tamanho das lesões foi avaliado semanalmente por 9 semanas. O gráfico mostra a medida do tamanho da pata onde cada ponto é representativo da média das medidas de 8 animais para cada um dos grupos. ANOVA, seguido de Bonferroni. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , quando comparados ao grupo L.A. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. (B) Avaliação da carga parasitária por diluição limitante. Camundongos BALB/c foram tratados com EVs de células B-1 infectadas ou não e posteriormente infectados com  $1 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Após 9 semana, as patas foram assepticamente removidas e a suspensão celular diluída em microplacas na razão 2. Após 7 dias a presença da forma promastigota do parasita foi avaliada por observação microscópica. Foram utilizados 6 animais em cada grupo experimental. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. Barras representam a média da triplicata, e os erros das barras denotam o desvio padrão. Dados são representativos de três experimentos independentes. Análise estatística, ANOVA duas-vias seguido por Kruskal-Wallis, \*  $P < 0,05$ , quando foram comparados os grupos EV B-1 e EV B-1 L.A e \*\*  $P = 0,0022$ , quando comparados ao grupo L.A





**Figura 15 – Análise histológica das lesões das patas de camundongos BALB/c.** Análise histológica das lesões de pata de camundongos BALB/c tratados com EVs de células B-1 infectadas ou não e, posteriormente, infectados por 9 semanas com  $1 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. A. grupo PBS (camundongos tratados com PBS e não infectados), B. grupo L.A (camundongos tratados com PBS e infectados), C. grupo EV B-1 (camundongos tratados com EVs de células B-1 não infectadas e posteriormente infectados) e D. grupo EV B-1 L.A (camundongos tratados com EVs de células B-1 infectadas e posteriormente infectados). Coloração – hematoxilina-eosina (HE). As flechas indicam a presença do parasita no vacúolo parasitófago. Aumento de 1000 X vezes (direita). Setas pretas indicam a forma amastigota do parasita e asteriscos indicam as regiões de infiltrado celular.



## 5. DISCUSSÃO

Células B-1 podem modular a resposta imunológica por produzir grandes quantidades de IL-10 e IgM (O'Garra et al., 1992). Estímulos, infecciosos ou não, podem alterar essa produção e assim modular a imunidade. Mussalem *et al.* (2012) demonstraram aumento significativo da produção da citocina IL-10 pelas células B-1 após estímulo com componentes de *Propionibacterium acnes*. A fagocitose *in vivo* de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* também levaram a aumento na produção de IL-10 pelas células B-1 (Geraldo et al., 2016). Além disso, também já foi demonstrado que a produção de IL-10 pelas células B-1 pode levar a imunossupressão de macrófagos peritoneais murinos e contribuir para diminuição da capacidade microbicida dessas células (Popi et al., 2004). Todas essas observações sugerem que células B-1 respondem após estímulo, mas ainda não foi demonstrado se essas células liberam EVs espontaneamente e/ou sob estímulo e o papel dessas EVs sobre outras células do sistema imunológico.

As vesículas extracelulares (EVs) obtiveram grande importância no campo da imunologia devido, principalmente, à sua capacidade de levar sinalização e transferência de biomoléculas (comunicação) entre as células do sistema imunológico (revisado por Yáñez-Mó, et al., 2015 e van der Pol, et al., 2012). EVs podem carrear as diferentes categorias de biomoléculas: proteínas, lipídios, ácidos nucleicos (principalmente micro-RNA) e açúcares, fornecendo assim um meio de comunicação único que permite o carregamento simultâneo de múltiplos sinalizadores. Adicionalmente, a comunicação por EVs dispensa o contato célula-célula e permite que a mensagem seja levada também para locais remotos de sua origem (revisado por Théry et al., 2002, Qin e Xu, 2014 e Yáñez-Mó et al., 2015). EVs liberadas por células do sistema imunológico e células que não compõem o sistema imunológico participam da regulação da resposta imunológica. Devido a esta propriedade, aplicações terapêuticas baseadas em vesículas já estão sendo testadas clinicamente para o tratamento de doenças inflamatórias, autoimunes e câncer (revisado em Robbins et al., 2014). Portanto, estudar EVs liberadas por células do sistema imunológico e o impacto dessas EVs sobre outras células e sua função na imunidade, em especial para células ainda pouco estudadas como células B-

1, pode trazer informações importantes e relevantes sobre a imunidade e sua aplicação em várias doenças.

Nossos resultados mostraram que células B-1 liberam espontaneamente EVs e o estímulo com o parasita *L. (L.) amazonensis* levou a aumento dessa produção, principalmente em EVs com tamanho característico de exossomos (100 nm). Embora a composição dessas EVs ainda não tenha sido completamente caracterizada, as análises de citometria de fluxo deste trabalho mostraram que EVs espontaneamente liberadas por células B-1 carregam moléculas MHC II. Interessantemente, após o estímulo com o parasita, EVs liberadas pelas células B-1 diminuíram a expressão dessas moléculas, sugerindo que o parasita pode estar modulando a expressão de MHC classe II nas vesículas. Diversos estudos mostraram que *L. (L.) amazonensis* modula expressão de moléculas MHC II reduzindo a sua expressão em macrófagos infectados (Costa et al., 2018; Courret et al., 2001).

A ação de EVs provenientes de células B-1 sobre macrófagos murinos demonstraram que EVs provenientes de células B-1 infectadas atuaram de maneira diferente na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, expressão de iNOS e fagocitose, em relação as EVs produzidas por células B-1 não infectadas. Ainda, EVs produzidas após 24 horas de cultivo na presença ou ausência do parasita mostraram também efeitos diferentes daquelas liberadas após 48 horas sob as mesmas condições. Estes dados sugerem fortemente que houve alteração na composição entre as EVs produzidas por células B-1 infectadas ou não, como também na composição de EVs produzidas por células B-1 após 24 e 48 horas de contato com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Hassani *et al.*, (2013) mostraram que exossomos liberados por macrófagos infectados com *L. (L.) mexicana* apresentaram alterações na sua composição, em comparação a exossomos de macrófagos não infectados. Neste estudo, GP63 foi a única proteína do protozoário identificada nos exossomos. Essa alteração na composição dos exossomos também refletiu o perfil de ativação de MAPKs de macrófagos naíves estimulados com exossomos provenientes de macrófagos infectados pelo parasita em relação aos não infectados (Hassani *et al.*, 2013). Esses dados demonstram que células

infectadas por *Leishmania* podem alterar a composição das EVs liberadas e, assim, influenciar a reposta de células estimuladas com essas vesículas.

Esta hipótese foi confirmada por Cronemberger-Andrade *et al.* (2014) os quais mostraram que vesículas extracelulares liberadas por macrófagos de camundongos BALB/c infectados por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* modularam macrófagos naïves de origem medular para um perfil pró-inflamatório, em comparação a vesículas liberadas por macrófagos não infectados. Similarmente, macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* (BCG) também produziram vesículas extracelulares com a capacidade de levar a respostas pró-inflamatórias tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Bhatnagar *et al.*, 2007). Outros patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* e *Toxoplasma gondii* também foram usados na infecção de macrófagos e as EVs produzidas pelas células infectadas estimularam, *in vitro*, respostas pró-inflamatórias. No caso do *Mycobacterium tuberculosis*, as vesículas liberadas pelos macrófagos infectados estimularam produção de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-12 por macrófagos naïves (Bhatnagar *et al.*, 2007).

Nossos dados demonstraram que nos ensaios com macrófagos da linhagem J774A.1 que foram tratados com EVs de células B-1 infectadas houve aumento da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, sendo que esse perfil se manteve tanto para EVs produzidas em 24 como em 48 horas. Além disso, a expressão gênica de iNOS também sofreu aumento tanto nos estímulos com EVs de 24 quanto de 48 horas, porém a capacidade fagocítica só aumentou com o estímulo de EVs liberadas em 48 horas de infecção. Estes dados sugerem que células J774A.1 foram muito sensíveis ao tratamento com EVs provenientes de células B-1 infectadas com o parasita, alterando a expressão de citocinas pró (TNF- $\alpha$  e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10), iNOS e a capacidade fagocítica.

Todos os experimentos realizados com macrófagos de linhagem também foram realizados com culturas primárias de macrófagos de origem medular tanto de camundongos BALB/c quanto C57BL/6. Essas linhagens de camundongos são amplamente utilizadas em estudos com os parasitas *Leishmania* devido a suas respostas contrastantes à infecção. Camundongos BALB/c são muito vulneráveis à infecção por *L. (L.) amazonensis* enquanto

que animais C57BL/6 não desenvolvem infecção crônica, já que após desenvolver a lesão inicial os animais resolvem a infecção pelo parasita em poucas semanas (McMahon-Pratt *et al.*, 2004). Em resposta a infecção por *L. (L.) amazonensis*, camundongos BALB/c apresentam um padrão de resposta Th2, porém a resistência de camundongos C57BL/6 não parece estar totalmente ligada ao perfil Th1, como esperado (Afonso e Scott, 1993). Probst *et al.* (2012) mostraram que macrófagos de animais C57BL/6 infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* aumentaram a expressão de genes relacionados ao controle da infecção, sugerindo que as células desses animais conseguem responder com mecanismos efetores celulares frente à infecção. Logo, as diferenças genéticas dessas duas linhagens poderiam também levar a diferenças na composição e funcionalidade das EVs produzidas pelas células B-1.

Os resultados da ativação de macrófagos medulares de camundongos BALB/c e C57BL/6, estimulados com vesículas extracelulares provenientes de células B-1 da linhagem relacionada, mostraram que as respostas não caracterizaram perfis exclusivamente de suscetibilidade ou resistência, respectivamente. Macrófagos medulares originados de camundongos BALB/c tiveram seu perfil de citocinas semelhantes aos macrófagos de linhagem J774A.1 (background BALB/c): EVs de células B-1 infectadas por 24 horas levaram a aumento na expressão de IL-6 e IL-10, mas sem alteração para o gene TNF- $\alpha$ . Já a expressão em macrófagos medulares tratados com EVs de 48 horas mostrou aumento mais evidente, assim como ocorrido em macrófagos de linhagem J774A.1. Por outro lado, macrófagos medulares da linhagem C57BL/6 tiveram sua expressão gênica diferente conforme o estímulo. No tratamento com EVs de células B-1 infectadas por 24 horas, houve aumento da expressão das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 enquanto que IL-10 foi quase totalmente suprimida. Porém, nas células tratadas com EVs de células B-1 infectadas por 48 horas houve aumento da expressão de IL-10 enquanto a transcrição de TNF- $\alpha$  foi diminuída.

As citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-6 são citocinas importantes no ambiente inflamatório causado pela infecção com *Leishmania* spp. TNF- $\alpha$ , juntamente com INF- $\gamma$ , são citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo controle da infecção (Liew *et al.*, 1990; Maspi *et al* 2016;

*Fromm et al.*, 2016). No entanto, a produção exacerbada dessas citocinas é responsável também pelo dano tecidual no processo inflamatório. Em contrapartida, a IL-10 e TGF- $\beta$  são citocinas anti-inflamatórias responsáveis por suprimir a resposta imune e diminuindo assim o dano tecidual e os níveis de citotoxicidade mediado principalmente pelas células T CD8+ (Couper *et al.*, 2008; Scott e Novais, 2016). Apesar de existir esse balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, muitos microrganismos patogênicos são capazes de alterar esse equilíbrio a fim de promover sua sobrevivência e evasão das respostas do sistema imunológico (Schmid-Hempel, 2008). Entre esses patógenos, *Leishmania* pode contribuir para a exacerbação da doença tanto pela ativação como supressão de citocinas pró e/ou anti-inflamatórias (Arango, *et al.*, 2014; Bertholet *et al.*, 2003). A exemplo dessa modulação, Antonelli *et al.*, (2005) mostrou que pacientes com lesões maiores apresentaram altos níveis de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  apesar da presença de IL-10. Portanto, um equilíbrio na resposta com a presença de citocinas tanto inflamatório como anti-inflamatórias parece ser um dos fatores que contribuem para a contenção de resposta prejudicial ao hospedeiro.

Outros ensaios de funcionalidade foram realizados para caracterizar melhor o papel das EVs de células B-1. Macrófagos medulares provenientes de camundongos BALB/c apresentaram redução significativa na transcrição do gene iNOS quando tratados com EVs de células B-1 infectadas durante 48 horas. Essa redução também foi vista em macrófagos medulares de C57BL/6 tratados com EVs de células B-1 de 24 horas, no entanto quando os macrófagos de animais C57BL/6 foram submetidos às EVs de células B-1 infectadas por 48 horas a expressão de iNOS teve aumento significativo. O aumento de transcritos de iNOS sugere que a ativação dos macrófagos da linhagem C57BL/6 é mais adequada para o controle e/ou eliminação do parasita, porém esse fato ainda precisa ser melhor investigado. Balestieri *et al.* (2002) mostraram que a neutralização das citocinas IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$  por anticorpos não levou a aumento na produção de NO indicando que essas citocinas não contribuem com a inibição da síntese de NO ocasionada pelo próprio parasita *L. (L.) amazonensis*. Entretanto, a eliminação efetiva do protozoário *L. (L.) amazonensis* parece não estar ligada somente a síntese de NO, mas também a produção de ânion superóxido (Mukbel *et al.*, 2007).

Com relação à capacidade fagocítica das células tratadas com EVs, houve aumento significativo em macrófagos de linhagem J774A.1 tratados com EVs de 48 horas, mas nenhuma alteração no índice fagocítico de macrófagos medulares de camundongos BALB/c foi detectada. Já macrófagos medulares de animais da linhagem C57BL/6 tratados com EVs de células B-1 infectadas por 24 ou 48 horas induziram aumento na capacidade fagocítica.

Considerando que células B-1 estimuladas com o parasita liberaram EVs capazes de alterar a produção de citocinas nos macrófagos aqui avaliados, tornou-se inevitável avaliar o papel dessas EVs no curso da infecção. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento de camundongos BALB/c com EVs de células B-1 infectadas ou não com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* contribuíram para o controle da infecção experimental por *Leishmania*. Gonzaga *et al.* (2018) mostraram que células B-1 participam da resistência à infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Camundongos XID (deficientes em células B-1) apresentaram maior suscetibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis* em comparação a camundongos BALB/c infectados. A transferência adotiva de células B-1 para camundongos XID promoveu diminuição da carga parasitária em comparação ao controle (camundongos XID). Embora ainda não completamente elucidados, os mecanismos envolvidos com essa proteção podem estar relacionados também com as vesículas extracelulares. EVs de células B-1 infectadas estimularam em macrófagos o aumento da expressão de citocinas IL-6 e IL-10 em relação as EVs liberadas por células não infectadas. IL-6 pode promover o aumento do recrutamento de fagócitos (Matte e Olivier 2002), o que justificaria porque animais tratados com EVs de células B-1 infectadas tem maior infiltrado celular e edema (tamanho da lesão) em comparação a animais tratados com EVs provenientes de células B-1 não infectadas. IL-10 pode estar ao melhor controle da resposta inflamatória, favorecendo uma resposta mais controlada.

Em resumo, células B-1 podem liberar EVs que interagem com macrófagos alterando a produção de citocinas e a capacidade fagocítica dessas células. Essa modulação pode influenciar o curso da infecção experimental com *L. (L.) amazonensis* levando a menor crescimento das lesões e a menor carga parasitária. Assim, este trabalho mostrou pela

primeira vez que células B-1 liberam EVs que são capazes de alterar as funções de macrófagos, influenciar o processo da infecção *in vivo*, agindo como novo mecanismo de comunicação celular.

## 6. CONCLUSÕES

- As células B-1 são capazes de liberar vesículas extracelulares e essas partículas apresentam diâmetro médio de 100 nm;
- A liberação das EVs por células B-1 ocorre de maneira espontânea, porém há aumento na produção destas partículas após 24 ou 48 horas de estímulo com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- A microscopia eletrônica de varredura confirmou a liberação das vesículas extracelulares por células B-1;
- EVs de células B-1 carregam em sua superfície moléculas de MHC classe II mas essa expressão é drasticamente reduzida em EVs de células B-1 que foram estimuladas com o parasita;
- Macrófagos da linhagem J774A.1 que foram tratados com EVs de células B-1 infectadas tornaram-se ativados, mostrando perfil misto de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10), aumento na expressão de iNOS e também na capacidade fagocítica;
- Os macrófagos das linhagens BALB/c e C57BL/6 responderam diferentemente ao tratamento com EVs das células B-1 infectadas, tanto na expressão de citocinas anti e pró-inflamatórias, expressão de iNOS e a capacidade fagocítica;
- EVs de células B-1 alteraram o curso da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*, diminuindo a lesão e a carga parasitária nos animais infectados.



## 1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI ABDALLAH, D. S.; DENKERS, E. Y. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. **Front Immunol**, v. 3, p. 382, 2012.

COURRET N, FREHEL C, PRINA E, LANG T, ANTOINE JC. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology**, v.122, n.3, p.263-79, Mar, 2001.

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, v. 61, n. 7, p. 2952-9, Jul 1993.

ALDRIDGE, J. R.; VOGEL, I. A. Macrophage biology and their activation by protozoan-derived glycosylphosphatidylinositol anchors and hemozoin. **J Parasitol**, v. 100, n. 6, p. 737-42, Dec 2014.

ALMEIDA, S. R. et al. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ANTOINE, J. C. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect Immun**, v. 58, n. 3, p. 779-87, Mar 1990.

ANTONELLI LR, DUTRA WO, ALMEIDA RP, BACELLAR O, CARVALHO EM, GOLLOB KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunol Lett**, v.101, n.2, p.226 30, 2005.

ARANGO DUQUE G, FUKUDA M, TURCO SJ, STÄGER S, DESCOTEAUX A. *Leishmania* promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI. **J Immunol**, v.193, n.5, p.2363-72, Sep, 2014.

ARCA, 2014. **Notícias da ARCA.** Disponível em: <<http://www.arcabrasil.org.br/blog/2014/11/vacina-contraleishmaniose-tem-eficacia-de-96/>>. Acesso em 16 jul 2017.

ARCANJO, A. F. et al. B-1 cells modulate the murine macrophage response to *Leishmania major* infection. *World J Biol Chem*, v. 8, n. 2, p. 151-162, May 2017. POPI, A. F.; LONGO-MAUGÉRI, I. M.; MARIANO, M. An Overview of B-1 Cells as Antigen-Presenting Cells. *Front Immunol*, v. 7, p. 138, 2016.

ARCANJO, A. F. et al. The PGE2/IL-10 Axis Determines Susceptibility of B-1 Cell-Derived Phagocytes (B-1CDP) to *Leishmania major* Infection. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0124888, 2015.

BABAI, B. et al. Depletion of peritoneal CD5+ B cells has no effect on the course of *Leishmania major* infection in susceptible and resistant mice. **ClinExpImmunol**, v. 117, n. 1, p. 123-9, Jul, 1999.

BACELLAR O, LESSA H, SCHRIEFER A, MACHADO P, RIBEIRO DE JESUS A, DUTRA WO, GOLLOB KJ, CARVALHO EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun**. Dec;70(12):6734-40. 2002.

BALESTIERI, F. M. et al. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes Infect**, v. 4, n. 1, p. 23-9, Jan 2002.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, Mar 1998.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO D.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; MOMEN H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS A.; ALMEIDA R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO M.; CARVALHO E. M. et al. **Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease**. *Am J. Trop Med Hyg*, V. 44, N. 5, Mai, 1991.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1097-106, Aug 2007.

BELKAID Y, PICCIRILLO CA, MENDEZ S, SHEVACH EM, SACKS DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502-7, 2002.

BENNETT, C. L. et al. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania*

mexicana amastigotes. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 3, p. 876-83, Mar 2001.

BERLAND, R.; WORTIS, H. H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 253-300, 2002.

BERTHOLET S, DICKENSHEETS HL, SHEIKH F, GAM AA, DONNELLY RP, KENNEY RT.  
Leishmania donovani-  
induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. **Infect Immun.**, v. 71, n.4, p.2095-101, Apr, 2003.

BHATNAGAR, S. et al. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3234-44, Nov 2007

BOGDAN, C. et al. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **Eur J Immunol**, v. 20, n. 5, p. 1131-5, May 1990.

BOGSAN, C. S. et al. B-1 cells are pivotal for in vivo inflammatory giant cell formation. **Int J Exp Pathol**, v. 86, n. 4, p. 257-65, Aug 2005.

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J Immunol**, v. 155, n. 6, p. 3102-11, Sep 1995.

BRUNETTE, Gary W. et al. CDC Yellow Book 2018: Health Information for International Travel. 1<sup>a</sup> ed, capítulo III. **Nova Iorque: Universidade de Oxford**. 2017.

BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY GL, VANDESOMPELE J, WITTEWER CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v.55, n.4, p.611-22, Apr, 2009.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 873-82, Nov 2007.

CHAUDHARY, R. et al. Immunomodulation in human dendritic cells leads to induction of interferon-gamma production by *Leishmania donovani* derived KMP-11 antigen via activation of NF- $\kappa$ B in Indian kala-azar patients. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 947606, 2014.  
component of acute non-specific inflammatory exudate. **IntImmunol**, v. 13, n. 9, p. 1193-201, Sep 2001.

CONSUELO, V. D.; NOAH, C. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, Los Angeles, **Dermatologic Therapy**, V. 22, N.6, Nov-Dez, 2009.

COSTANTINI, C.; CASSATELLA, M. A. The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 2, p. 221-33, Feb 2011.

COUPER KN, BLOUNT DG, RILEY EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J Immunol.**, v.1, n.9, p.5771-7, May, 2008.

CRONEMBERGER-ANDRADE, A. et al. Extracellular vesicles from *Leishmania*-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naïve macrophages. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3161, Sep 2014.

DE LORENZO, B. H. et al. Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. **Immunol Lett**, v. 114, n. 2, p. 110-8, Dec 2007.

DOMÍNGUEZ, M. et al. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. **J Exp Med**, v. 195, n. 4, p. 451-9, Feb 2002.

FROMM PD, KLING JC, REMKE A, BOGDAN C, KÖRNER H. Fatal Leishmaniasis in the Absence of TNF Despite a Strong Th1 Response. **Front Microbiol.** v.22, n.6, p.1520, Jan, 2016.

GABRIEL, C. et al. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **J Immunol**, v. 185, n. 7, p. 4319-27, Oct 2010.

GABRIEL C, MCMASTER WR, GIRARD D, DESCOTEAUX A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **J Immunol**, v.185, n. 7, p. 4319-27, Oct, 2010.

GAO, J. et al. Novel functions of murine B1 cells: active phagocytic and microbicidal abilities. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 4, p. 982-92, Apr 2012.

GAUBERT, S. et al. X-linked immunodeficiency affects the outcome of *Schistosoma mansoni* infection in the murine model. **Parasite Immunol**, v. 21, n. 2, p. 89-101, Feb 1999.

GERALDO, M. M.; COSTA, C. R.; BARBOSA F. M. C.; VIVANCO, B. C.; GONZAGA, W.F. K. M.; NOVAES E BRITO, R. R.; POPI, A. F.; LOPES, J. D.; XANDER, P. *In vivo* and *in vitro* phagocytosis of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes by B-1 cells. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 6, p. 365-376, 2016.

GHOSN, E. E. et al. Distinct progenitors for B-1 and B-2 cells are present in adult mouse spleen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 7, p. 2879-84, Feb 2011.

GHOSN, E. E.; RUSSO, M.; ALMEIDA, S. R. Nitric oxide-dependent killing of *Cryptococcus neoformans* by B-1- derived mononuclear phagocyte. **J LeukocBiol**, v. 80, n. 1, p. 36-44, Jul, 2006.

GONZAGA, W. F. et al. B-1 cells contribute to susceptibility in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Parasitology**, v. 142, n. 12, p. 1506-15, Oct 2015.

GONZAGA, W. F. K.M, M. M. GERALDO, B. C. VIVANCO, A. F. POPI, M. MARIANO, W. L.BATISTA, AND P. XANDER. Evaluation of experimental Infection with *L. (L.) amazonensis* in x-linked Immunodeficient mice. **J Parasitol**, 2017.

GREEN, P. J. et al. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. **Mol BiochemParasitol**, v. 66, n. 2, p. 319-28, Aug 1994.

GUEIRARD P., LAPLANTE A., RONDEAU C., MILON G., DESJARDINS M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 100-111. Jul (2008).

GUIMARÃES L. H., QUEIROZ A., SILVA J. A., SILVA S. C., MAGALHÃES V., LAGO E. L., MACHADO P. R., BACELLAR O., WILSON M. E., BEVERLEY S. M., CARVALHO E. M., SCHRIEFER A. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. **PLoS Negl Trop Dis**, v.1, n. 12, Dec, 2016.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 16, p. 6748-53, Apr 2009.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cell Microbiol**, v. 17, n. 9, p. 1286-94, Sep 2015.

HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*, v. 19, p.595-621, 2001.

HASSANI, K.; OLIVIER, M. Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 5, p. e2185, 2013.

HAYAKAWA, K. et al. Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. **Eur J Immunol**, v. 16, n. 10, p. 1313-6, Oct 1986.

HERBERT, D. R. et al. The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Parasite Immunol**, v. 24, n. 2, p. 95-101, Feb 2002.

HERZENBERG, L. A. B-1 cells: the lineage question revisited. **Immunol Rev**, v. 175, p. 9-22, Jun 2000.

HERZENBERG, L. A. et al. The Ly-1 B cell lineage. **Immunol Rev**, v. 93, p. 81-102, Oct 1986.

HOERAUF, A. et al. The Xid defect determines an improved clinical course of murine IAMAT, 2016. General Health Risks: Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.iamat.org/country/brazil/risk/leishmaniasis>>. Acesso em 16 jul 2017.

J. SAVILL, I. DRANSFIELD, C. GREGORY, AND C. HASLETT, "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses," *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 12, pp. 965– 975, 2002.

Ji, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, v. 71, n. 8, p. 4278-88, Aug 2003.

KALYAN, S.; KABELITZ, D. When neutrophils meet T cells: beginnings of a tumultuous relationship with underappreciated potential. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 3, p. 627-33, Mar 2014.

KIPPS, T. J. The CD5 B cell. **Adv Immunol**, v. 47, p. 117-85, 1989.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**, v. 30, n. 1, p. 16-34, Feb 2011.

LAINSON, R. e SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In W. Peters & R. Killick-Kendrick (eds.). **The Leishmaniases in Biology and Medicine**, v. 1, p. 1-120. London, Academic Press, 1987.

LANG, T. et al. Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J Cell Sci**, v. 107 ( Pt 1), p. 69-82, Jan 1994.  
leishmaniasis in susceptible mice. *Int Immunol*, v. 6, n. 8, p. 1117-24, Aug 1994.

LIÉVIN-LE MOAL, V.; LOISEAU, P. M. *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. **FEBS J**, v. 283, n. 4, p. 598-607, Feb 2016.

LIEW F. Y., PARKINSON C., MILLOTT S., SEVERN A., CARRIER M. Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in leishmaniasis. **Immunology**, v.69, p. 570-573, Jan, 1990.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 909-15, Jul 2013.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 83, 2012

MARCOS, M. A. et al. Isolation of peritoneal precursors of B-1 cells in the adult mouse. **Eur J Immunol**, v. 24, n. 5, p. 1033-40, May 1994.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 13, 2014.

MASPI N, ABDOLI A, GHAFFARIFAR F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathog Glob Health**, v.110, n.6, p.247-260, Sep, 2016.

MATTE, C., AND M. OLIVIER. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. **J Infect Dis**, v.185, n. 5, p.673-81, 2002.

MCPAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol Rev**, v. 201, p. 206-24, Oct 2004.

MELBY, P. C. et al. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 62, n. 3, p. 837-42, Mar 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral, 1ª ed., 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª ed., 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_americana.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf)> . Acesso em: 02 dec. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose\\_visceral\\_reducao\\_letalidade.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_visceral_reducao_letalidade.pdf)>



f> . Acesso em: 02 dec. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>>. Acesso em: 01 mai 2016.

MINOPRIO, P. et al. Xid-associated resistance to experimental Chagasi disease is IFN-gamma dependent. **J Immunol**, v. 151, n. 8, p. 4200-8, Oct 1993.

MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 4, p. 669-75, Apr 2007.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-77, 2005 Oct 29-Nov 4 2005.

MUSSALEM, J. S. et al. Adjuvant effect of killed *Propionibacterium acnes* on mouse peritoneal B-1 lymphocytes and their early phagocyte differentiation. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33955, 2012.

NG, L.G., HSU, A., MANDELL, M.A., ROEDIGER, B., HOELLER, C., MRASS, P., *et al.* Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. **PLoS Pathog**, v.4, 2008.

NOGUEIRA P. M, RIBEIRO K., SILVEIRA A. C., CAMPOS J. H., MARTINS-FILHO O. A., BELA S.R., CAMPOS M. A., PESSOA N. L., COLLI W., ALVES MJ., SOARES R. P., TORRECILHAS A. C. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **J Extracell Vesicles**, v.26, n. 4, Nov, 2015.

NOVAES, R. R. B. et al. In vitro and in vivo phagocytic ability of mouse B-1 cells. **Immunology and Immunogenetics Insights**, v. 2, n. 1, p. 31-39, Nov 2010.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 135-46, May 2010.

O'GARRA, A. et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 3, p. 711-7, Mar 1992.

OEHMCKE, S. et al. Stimulation of blood mononuclear cells with bacterial virulence factors leads to the release of pro-coagulant and pro-inflammatory microparticles. **Cell Microbiol**,

v. 14, n. 1, p. 107-19, Jan 2012.

O'GARRA, A. et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 3, p. 711-7, Mar 1992.

O'NEILL, H. C.; QUAH, B. J. Exosomes secreted by bacterially infected macrophages are proinflammatory. **Sci Signal**, v. 1, n. 6, p. pe8, 2008.

PALADI, C. E. S. et al. In vitro and in vivo activity of a palladacycle complex on Leishmania (Leishmania) amazonensis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1626, 2012.

PETERS, N. C., EGEN J. G., SECUNDINO N., DEBRABANT A., KIMBLIM N., KAMHAWI S., LAWYER P., FAY M. P., GERMAIN R. N., SACKS D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 15, n.32, p. 970-4, 2008.

PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of Leishmania amazonensis infection in C57Bl/6 mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p.79-82, Feb 2007.

POPI, A. F. et al. B-1 cells facilitate Paracoccidioides brasiliensis infection in mice via IL-10 secretion. **Microbes Infect**, v. 10, n. 7, p. 817-24, Jun 2008.

POPI, A. F. et al. Could a B-1 cell derived phagocyte "be one" of the peritoneal macrophages during LPS-driven inflammation? **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e34570, 2012.

POPI, A. F. et al. Microbicidal property of B1 cell derived mononuclear phagocyte. **Immunobiology**, v. 214, n. 8, p. 664-73, 2009.

POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. **Immunology**, v. 113, n. 3, p. 348-54, Nov 2004.

POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. **Immunology**, v. 113, n. 3, p. 348-54, Nov 2004.

PORTAL DE SAÚDE SUS, 2015. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/>>. Acesso em: 16 jul 2015.

PROBST, C. M. et al. A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to *Leishmania amazonensis* infection. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 22, 2012.

PUGA, I. et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. **Nat Immunol**, v. 13, n. 2, p. 170-80, Feb 2012.

QIN, J.; XU, Q. Functions and applications of exosome. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, v. 71, n. 2, 2014.

RAMER-TAIT, A. E. et al. Differential surface deposition of complement proteins on logarithmic and stationary phase *Leishmania chagasi* promastigotes. **J Parasitol**, v. 98, n. 6, p. 1109-16, Dec 2012.

RAPOSO, G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **J Exp Med**, v. 183, n. 3, p. 1161-72, Mar 1996.

REAL, F. et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **CellMicrobiol**, v. 16, n. 10, p. 1549-64, Oct 2014.

REZVAN, H.; MOAFI M. **An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article**. Homedam, Veterinary Research Forum, V. 6, N. 1, Mar, 2015.

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 195-208, Mar 2014.

ROTUREAU, B. et al. The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development? **Cell Microbiol**, v. 11, n. 5, p. 710-8, May 2009.

SCHMID-HEMPEL P. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.12, n.1513, p.85-98, Jan, 2009.

SCHUSTER, S.; HURRELL, B.; TACCHINI-COTTIER, F. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. **J Leukoc Biol**, v. 94, n. 4, p. 671-5, Oct 2013.

SCOTT P., NOVAIS F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 581-592, Jul, 2016.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 9, p. 581-92, 09 2016.

SILVA, M. T. Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 5, p. 675-83, May 2011.

SINGH P.P.; SMITH V.L.; KARAKOUSIS P. C.; SCHOREY J.S. Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells in vitro and in vivo. **J Immunol**, v.15, n.2, p. 777-785, Jul 2012.

COSTA SS, FORNAZIM MC, NOWILL AE, GIOGIO S. Leishmania amazonensis induces modulation of costimulatory and surface marker molecules in human macrophages. **Parasite Immunol**, Jan, 2018.

SOONG, L.; HENARD, C. A.; MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 735-51, Nov 2012.

THÉRY C., ZITVOGEL L., AMIGORENA S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nat Rev Immunol**, v.2, n. 8, p. 569-79. Aug, 2002.

THOMAS, C. J.; SCHRODER, K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. **Trends Immunol**, v. 34, n. 7, p. 317-28, Jul 2013.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R. B.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F. L.; BARBOSA, J. A. R.; BARBOSA, J. E. R.; FLOETER-WINTER, L. M., SHAW, J. J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. São Paulo, **Veterinary parasitology**, V. 149, N. 3-4, Ago, 2007.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILA-CEDILO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS R. Leishmaniasis: a review, Cidade do México, **F1000Research**, v.6, n. 750, Mai,

2017.: Published by World Health Organization (2010)

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in parasitology*, v. 28, n. 8, p. 335–44, ago. 2012.

VAN DER POL, E. et al. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. **J Thromb Haemost**, v. 10, n. 5, p. 919-30, May 2012.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J Immunol**, v. 173, n. 11, p. 6521-5, Dec 2004.

VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Bio**, v.18, n.3, p.7, Jun, 2002.

WANG, S. et al. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. **J Neurosci**, v. 31, n. 20, p. 7275-90, May 2011.

WHO. Disponível em: < [http://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/)>. Acesso em: 12 jan 2018.

WHO. Leishmaniasis. **WHO Technical Report Series**, n.375. Publicado por World Health Organization (2015).

WHO. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases Leishmaniasis Published by World Health Organization (2000).

WILSON, J. et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 10, p. e1000179, Oct 2008.

WONG, S. C. et al. Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 8, p. 2296-307, Aug 2010.

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Mol Immunol**, v. 45, n. 12, p. 3371-82, Jul 2008.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **J Extracell Vesicles**, v. 4, p. 27066, 2015.

ZAMBONI, D. S.; RABINOVITCH, M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1225-33, Mar 2003.

ZAMBRANO-VILLA S., ROSALES-BORJAS D., CARRERO J. C., ORTIZ-ORTIZ L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol**, v.18, n. 6, p. 272-8. Jun, 2002.

ZHANG, B. et al. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. **Front Immunol**, v. 5, p. 518, 2014

ZHONG X.; GAO W.; DEGAUQUE N.; BAI C.; LU Y.; KENNY J.; OUKKA M.; STROM T.B.; ROTHSTEIN T.L. Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 9, p.2400-4, Sep 2007.

ZITVOGEL, L. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nat Med**, v. 4, n. 5, p. 594-600, May 1998.

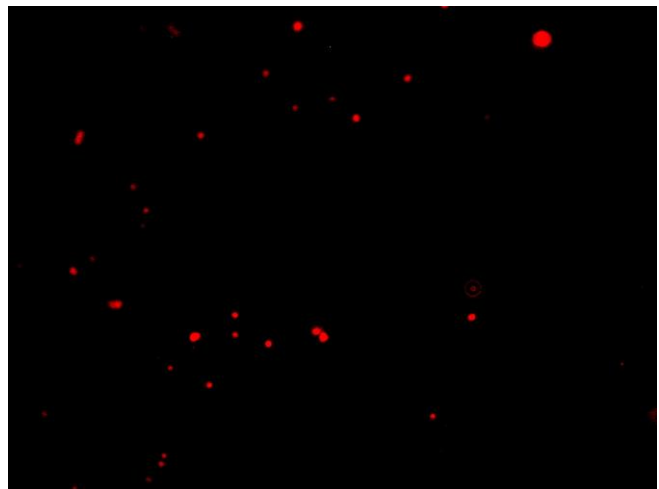
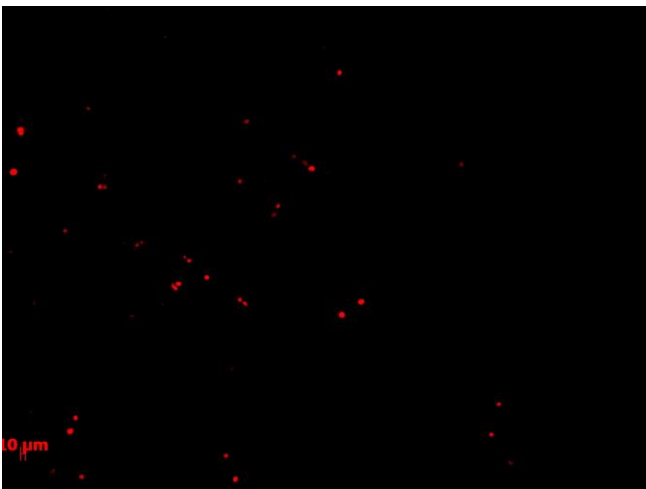
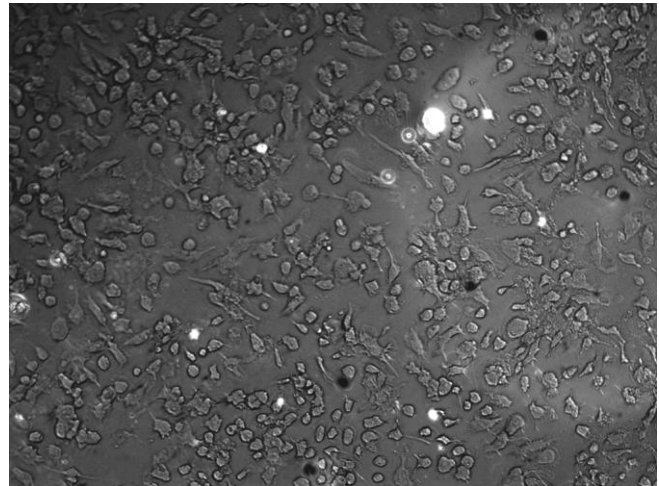
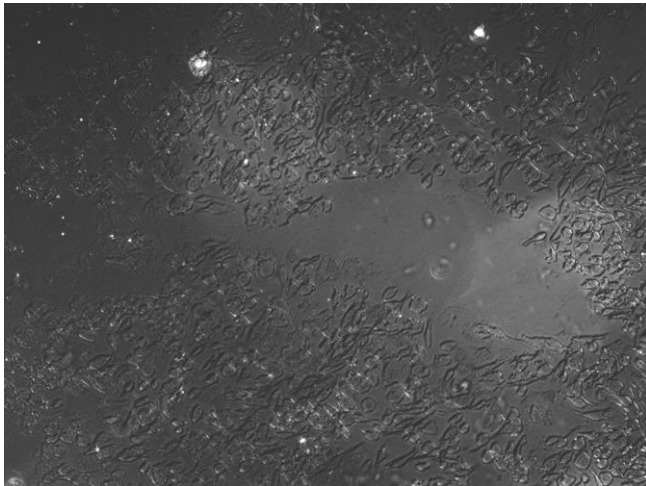
## APÊNDICES

- Avaliação da viabilidade células B-1 após a infecção com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

### Células B-1 infectadas

24 horas

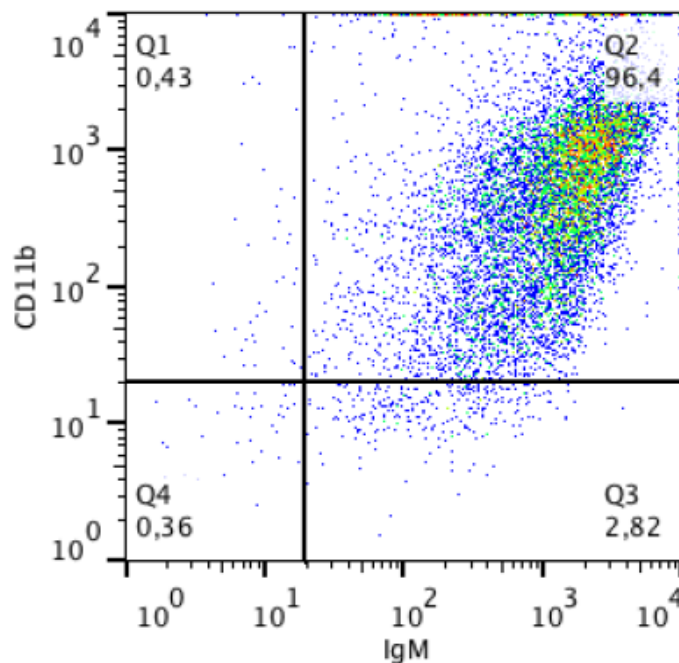
48 horas



**Figura 16 - Viabilidade de células B-1 infectadas com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.** As células B-1 foram coletadas e purificadas da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e posteriormente infectadas com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 5) durante 24 e 48 horas. Após os períodos, as mesmas foram marcadas com iodeto de propídeo (PI).

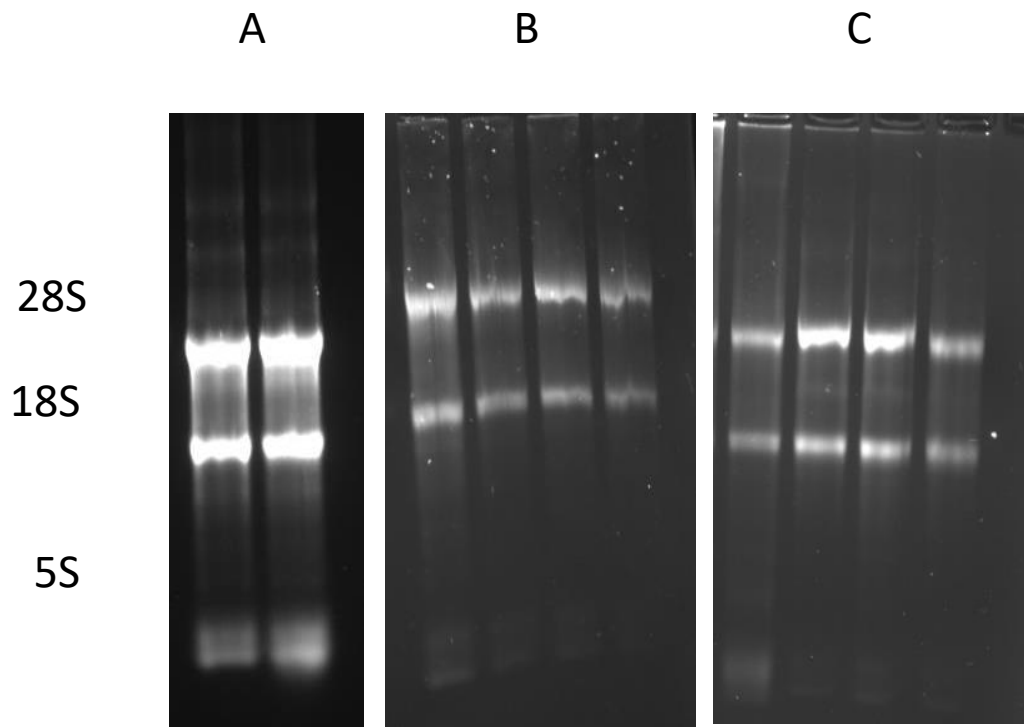


- **Avaliação da purificação de células B-1 por meio de colunas magnéticas**



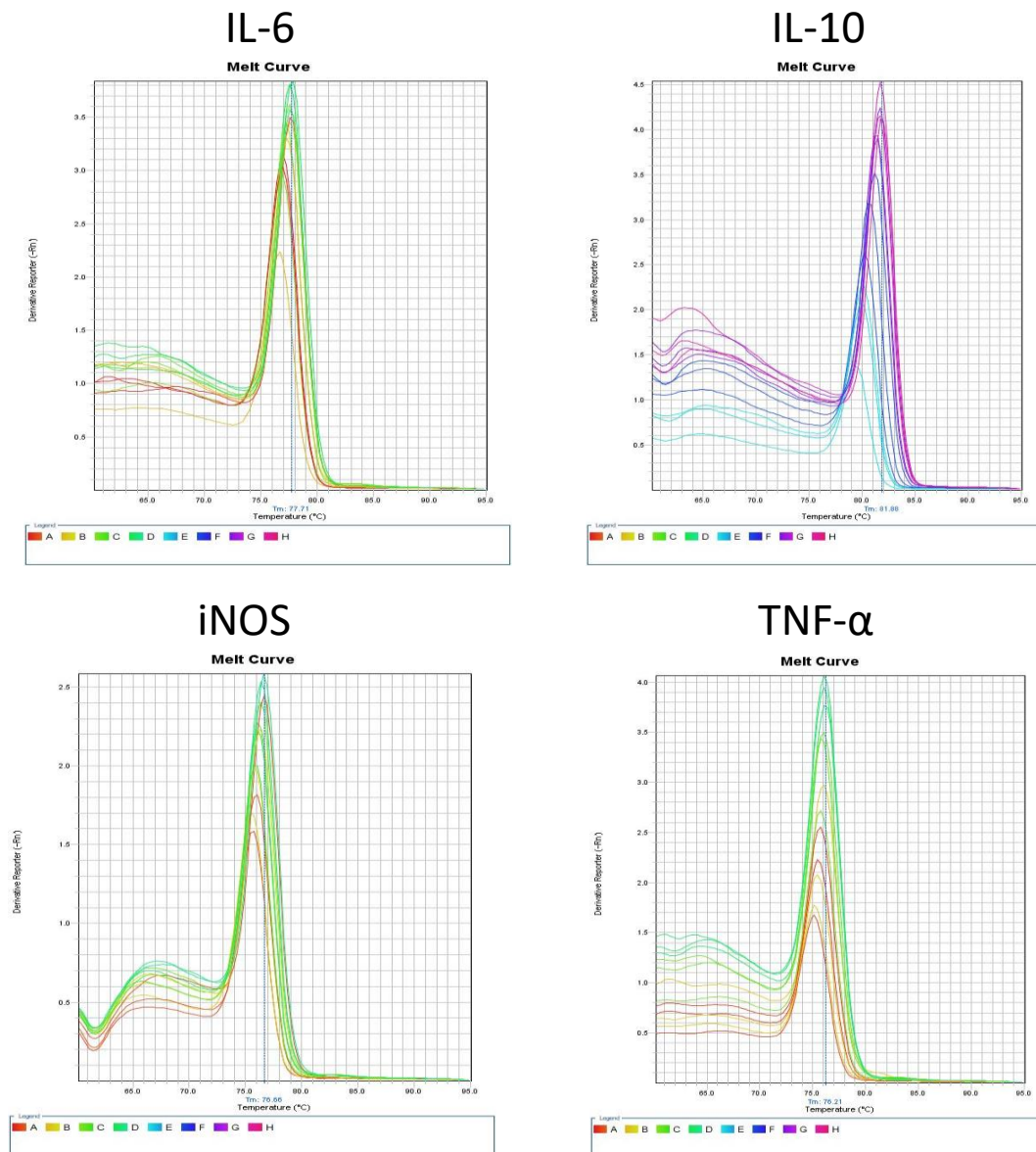
**Figura 17 - Dot Plot representativo de células B-1 purificadas por colunas magnéticas.** Células B-1 peritoneais provenientes de camundongos C57BL/6 foram purificadas usando beads magnéticas anti-CD23 para a seleção negativa e anti-CD19 para seleção positiva. Após a purificação, as células CD19+CD23- foram duplamente marcadas com anti-IgM (marcado com FITC) e anti-CD11b (marcado com PE) e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD). As porcentagens das populações estão indicadas em cada quadrante. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

- **Avaliação da integridade do material genético (RNA total) utilizado para a confecção de cDNA**



**Figura 18 – Integridade do RNA.** RNA extraído de macrófagos de linhagem J774A.1 e macrófagos medulares estimulados ou não com EVs de células B-1 infectadas ou não com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Imagens representativas de três experimentos independentes. **A** (macrófagos de linhagem J774A.1), **B** (macrófagos medulas de camundongos BALB/c) e **C** (macrófagos medulares de camundongos C57BL/6). As células estimuladas com EVs de células B-1 infectadas ou não com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Gel de agarose a 1,5% corado com GelRed mostrando as bandas 28S, 18S e 5S.

○ **Curvas de dissociação (Curva de Melting)**



**Figura 19 - Curvas de melting (curva de dissociação) dos genes IL-6, IL-10, iNOS e TNF- $\alpha$ .** As curvas são referentes aos experimentos de qRT-PCR realizados a partir de cDNA de macrófagos de linhagem J774A.1 e macrófagos medulares de origem das linhagens BALB/c e C57BL/6. Os macrófagos foram estimulados com EVs de células B-1 infectadas ou não com *L. (L.) amazonensis* por 24 ou 48 horas. Imagens representativas de três experimentos independentes.

**ANEXOS**



## Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 07 de fevereiro de 2018  
CEUA N 1359120716

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Maytê Dos Santos Toledo  
Área: Ciências Biológicas  
Patrícia Xander Batista (orientador)

Título da proposta: "Caracterização morfológica e funcional de vesículas extracelulares liberadas por células B-1 infectadas por *Leishmania leishmania amazonensis*".

### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 14/janeiro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Os objetivos deste estudo são: caracterizar morfológicamente as EVs liberadas pelas células B-1 na presença ou ausência de infecção *in vitro* por *L. (L.) amazonensis*; avaliar a influência das EVs provenientes de células B-1 infectadas ou não com o parasita sobre a ativação de macrófagos medulares provenientes de camundongos BALB/c. Nossos resultados mostraram que células B-1 produzem espontaneamente EVs e a infecção com o parasita *L. (L.) amazonensis* estimulou o aumento dessa liberação, principalmente aquelas com tamanho característico de exossomos (100 nm). Embora a composição dessas EVs ainda não tenha sido caracterizada, as análises da ação dessas EVs sobre os macrófagos demonstraram que EVs provenientes de células B-1 infectadas atuaram de maneira diferente na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, expressão de iNOS e fagocitose, em relação as EVs produzidas por células B-1 não infectadas. Ainda, EVs produzidas após 24 horas de cultivo na presença ou ausência do parasita mostraram também efeitos diferentes daquelas liberadas após 48 horas sob as mesmas condições. Estes dados sugerem fortemente que houve alteração na composição entre as EVs produzidas por células B-1 infectadas ou não, como também na composição de EVs produzidas por células B-1 após 24 e 48 horas de contato com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Portanto, EVs provenientes de células B-1, infectadas ou não com o parasita parecem ter papel modulador sobre outras células. Os dados obtidos com os macrófagos levaram a outros questionamentos, como o de avaliar o papel dessas EVs no curso da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Essa avaliação é importante para verificar o efeito *in vivo* dessas vesículas no curso da infecção, se EVs podem ativar macrófagos *in vivo* e se essa ativação é suficientemente importante para alterar a carga parasitária e o processo inflamatório induzido pelo parasita. ".

Comentário da CEUA: "APROVADO - Sr Pesquisador, notificamos que a emenda solicitando adição de 90 camundongos Balb/c, fêmeas, de 6-8 semanas de idade para realização de novos experimentos, foi aprovada. ".

Prof. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Tatiana Helfenstein  
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo



## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização morfológica e funcional de vesículas extracelulares liberadas por células B-1 infectadas por *Leishmania leishmania amazonensis*", protocolada sob o CEUA nº 1359120716, sob a responsabilidade de **Maytê dos Santos Toledo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 29/09/2016.

We certify that the proposal "", utilizing 372 Isogenics mice (372 females), protocol number CEUA 1359120716, under the responsibility of **Maytê dos Santos Toledo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 09/29/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **setembr** a **setembr** Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **372**

Linhagem: **BALB/c**

Peso: **30 a 30 g**

Resumo: A resposta imunológica para o protozoário do gênero *Leishmania* spp é complexa e envolve uma série de mecanismos de interação entre as diversas células do sistema imune e o parasita. No hospedeiro mamífero o parasita apresenta-se como intracelular obrigatório e, dessa forma, a resposta imunológica eficaz para eliminação do patógeno depende da ativação das células fagocíticas e da resposta adaptativa do tipo Th1. Células do sistema imunológico realizam complexa comunicação intercelular mediada por fatores solúveis, contato célula-célula e/ou mais recentemente tem sido descrito o envio de mensagens via liberação de vesículas extracelulares (EVs), as quais podem carrear mediadores e sinais de uma célula ativada para outra não ativada. Apesar da importância das EVs, ainda são poucos os trabalhos que tem demonstrado a influência de EVs liberadas por células infectadas por *Leishmania* e a resposta imunológica. Nosso grupo demonstrou recentemente que células B-1, um subtipo de linfócitos B, são capazes de fagocitar promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e produzir citocinas em resposta a esta infecção. Dados preliminares demonstraram que células B-1 infectadas pelo parasita liberaram EVs capazes de modular a resposta e a ativação de macrófagos. A caracterização das EVs de células B-1 e de seu potencial imunoregulador são dados inéditos na literatura que podem contribuir de forma significativa para o melhor entendimento da participação das células B-1 tanto na fisiopatogenia das leishmanioses como também para entender a função dessas células no curso natural da resposta imunológica. Assim, este trabalho propõe caracterizar morfológica e funcionalmente as EVs liberadas por células B-1 infectadas por *L. (L.) amazonensis* assim como caracterizar melhor a influência dessas EVs na ativação/modulação de macrófagos. ANIMAIS Serão utilizados: 372 camundongos isogênicos BALB/c, fêmeas, 30 g, 6-8 semanas Procedência: CEDEME Manutenção: Biotério central do campus Diadema Cronograma do estudo, início previsto para: setembro/2016 com término previsto para: setembro/2018

Local do experimento:

São Paulo, 23 de julho de 2017

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Tatiana Helfenstein  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo





## Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 07 de fevereiro de 2018  
CEUA N 1359120716

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Maytê Dos Santos Toledo  
Área: Ciências Biológicas  
Patrícia Xander Batista (orientador)

Título da proposta: "Caracterização morfológica e funcional de vesículas extracelulares liberadas por células B-1 infectadas por *Leishmania leishmania amazonensis*".

### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 14/janeiro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Os objetivos deste estudo são: caracterizar morfológicamente as EVs liberadas pelas células B-1 na presença ou ausência de infecção *in vitro* por *L. (L.) amazonensis*; avaliar a influência das EVs provenientes de células B-1 infectadas ou não com o parasita sobre a ativação de macrófagos medulares provenientes de camundongos BALB/c. Nossos resultados mostraram que células B-1 produzem espontaneamente EVs e a infecção com o parasita *L. (L.) amazonensis* estimulou o aumento dessa liberação, principalmente aquelas com tamanho característico de exossomos (100 nm). Embora a composição dessas EVs ainda não tenha sido caracterizada, as análises da ação dessas EVs sobre os macrófagos demonstraram que EVs provenientes de células B-1 infectadas atuaram de maneira diferente na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, expressão de iNOS e fagocitose, em relação as EVs produzidas por células B-1 não infectadas. Ainda, EVs produzidas após 24 horas de cultivo na presença ou ausência do parasita mostraram também efeitos diferentes daquelas liberadas após 48 horas sob as mesmas condições. Estes dados sugerem fortemente que houve alteração na composição entre as EVs produzidas por células B-1 infectadas ou não, como também na composição de EVs produzidas por células B-1 após 24 e 48 horas de contato com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Portanto, EVs provenientes de células B-1, infectadas ou não com o parasita parecem ter papel modulador sobre outras células. Os dados obtidos com os macrófagos levaram a outros questionamentos, como o de avaliar o papel dessas EVs no curso da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Essa avaliação é importante para verificar o efeito *in vivo* dessas vesículas no curso da infecção, se EVs podem ativar macrófagos *in vivo* e se essa ativação é suficientemente importante para alterar a carga parasitária e o processo inflamatório induzido pelo parasita. ".

Comentário da CEUA: "APROVADO - Sr Pesquisador, notificamos que a emenda solicitando adição de 90 camundongos Balb/c, fêmeas, de 6-8 semanas de idade para realização de novos experimentos, foi aprovada. ".

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Tatiana Helfenstein  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo